

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**DETEÇÃO DE HEMOZOÍNA EM ERITRÓCITOS INFETADOS
COM *PLASMODIUM FALCIPARUM* POR CITOMETRIA DE
FLUXO, PARA MONITORIZAÇÃO DO EFEITO DE
ANTIMALÁRICOS**

DISSERTAÇÃO

Cláudia Patrícia Machado Lemos e Sousa

Mestrado em Microbiologia Aplicada

- 2013 -

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**DETEÇÃO DE HEMOZOÍNA EM ERITRÓCITOS INFETADOS
COM *PLASMODIUM FALCIPARUM* POR CITOMETRIA DE
FLUXO, PARA MONITORIZAÇÃO DO EFEITO DE
ANTIMALÁRICOS**

Dissertação orientada pelos Professores Doutores
Thomas Hänscheid (Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa)
Ana Tenreiro (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Cláudia Patrícia Machado Lemos e Sousa

Mestrado em Microbiologia Aplicada

- 2013 -



**DETEÇÃO DE HEMOZOÍNA EM ERITRÓCITOS INFETADOS
COM *PLASMODIUM FALCIPARUM* POR CITOMETRIA DE
FLUXO, PARA MONITORIZAÇÃO DO EFEITO DE
ANTIMALÁRICOS**

Cláudia Patrícia Machado Lemos e Sousa

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
2013**

Esta dissertação foi realizada no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, sob a orientação do Prof. Doutor Thomas Hänscheid, no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A Prof.^a Doutora Ana Tenreiro foi a orientadora interna, designada no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Thomas Hänscheid, pela orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Ana Tenreiro, pela orientação e atenção dispensada.

À Maria Rebelo, pelos preciosos conselhos e apoio.

À Unidade de Microbiologia Molecular e Infecção do Instituto de Medicina Molecular (Diretor: Prof. Doutor Mário Ramirez) e ao Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (Director: Prof. Doutor José Melo-Cristino), por me terem acolhido.

À unidade de Malária do Instituto de Medicina Molecular.

Às minhas colegas de laboratório Ana, Márcia e Rosangela, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos partilhados em conjunto.

Ao Bruno Silva, pelo incentivo final.

Um especial agradecimento à minha família, em particular aos meus pais e irmãos, por todo o amor.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada por me terem acompanhado nesta jornada.

Resumo

Plasmodium falciparum é a mais mortal das cinco espécies de *Plasmodium* que causam malária humana. A propagação deste parasita resistente a quase todos os antimaláricos disponíveis é um assunto fulcral e requer a monitorização da sua suscetibilidade aos diferentes antimaláricos.

Atualmente estão disponíveis diferentes testes *in vitro* para a avaliação da atividade dos antimaláricos, tais como a observação microscópica do desenvolvimento do parasita em eritrócitos, ensaios isotópicos e quantificação de proteínas do parasita. Infelizmente todos estes ensaios apresentam desvantagens quanto ao custo, tempo e dificuldade de execução.

O parasita da malária durante o seu desenvolvimento intra-eritrocítico, produz quantidades crescentes de um cristal denominado hemozoína, que pode ser usado como um indicador de maturação. A hemozoína tem a capacidade de despolarizar a luz, consequentemente a despolarização da luz pode ser detetada por métodos óticos como a citometria de fluxo. Para isso, fez-se uma simples adaptação de um citómetro de fluxo de forma a detetar a luz despolarizada, permitindo deste modo a deteção de eritrócitos infetados por *P. falciparum*.

Foram testados diferentes fármacos antimaláricos, em culturas de sangue humano infetado com estirpes de *Plasmodium falciparum* sensível e resistente à cloroquina.

O teste permitiu detetar a maturação do parasita em tempo real, o efeito inibitório de todos os fármacos testados, à exceção da pirimetamina, e ainda a resistência à cloroquina, em apenas 24 horas.

A deteção por citometria de fluxo da despolarização resultante da presença de hemozoína, permitiu desenvolver um teste de sensibilidade alternativo, de fácil execução, que exige pouco equipamento, sem a necessidade de adição de reagentes e produz resultados rápidos e fiáveis.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, resistência aos antimaláricos, teste de sensibilidade *in vitro*, citometria de fluxo, hemozoína.

Índice

Introdução	1
1. Malária	1
1.1. Panorama atual	1
1.2. Ciclo de vida do agente causal	1
1.3. Tratamento	3
1.4. História dos fármacos antimaláricos	4
1.5. Principais fármacos antimaláricos	5
1.6. Resistências	6
1.7. Mecanismos de resistência	6
1.8. Implicações/consequências das resistências	8
1.9. Detecção de resistência	8
1.10. Citometria de fluxo	10
1.10.1. <i>Forward Scatter</i> e <i>Side Scatter</i>	11
1.10.2. Fluorescência	11
1.10.3. Detecção do pigmento malárico por citometria de fluxo	11
Objetivo	12
Material e métodos	13
1. Soluções	13
2. Estirpes de <i>Plasmodium falciparum</i>	13
2.1. Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> na fase eritrocitária assexuada	13
2.2. Sincronização da cultura	14
3. Testes de sensibilidade	14
3.1. Preparação dos fármacos	15
3.2. Ajuste das condições de cultura	15
3.3. Teste de sensibilidade in vitro baseado na detecção de hemozoína por citometria	16
3.3.1. Equipamento	16
3.3.2. Ensaio	17
3.3.3. Monitorização da parasitemia através da detecção de fluorescência por citometria – SYBR® Green I	18
3.4. Teste de sensibilidade baseado no ensaio de HRP II	18
3.4.1. Revestimento das placas com anticorpo primário	18
3.4.2. Realização de ELISA-HRP II	18
3.5. Análise de resultados	20
3.5.1. Análise de resultados no software FlowJo	20
3.5.2. Cálculo do IC ₅₀	20
4. Ética	20

Resultados	21
1. Citometria de fluxo	21
1.1. Teste de sensibilidade	24
1.1.1. Fármacos inibidores da síntese de hemozoína	25
1.1.2. Fármacos inibidores da síntese de folatos	27
1.1.3. Peróxidos	28
2. Resumo dos IC ₅₀ calculados	30
Discussão	31
1. Citometria - avaliação da atividade antimalárica dos fármacos, durante a fase eritrocitária do parasita.	31
1.1.Deteção de hemozoína do parasita	31
1.1.1. Fármacos inibidores de hemozoína	33
1.1.2. Fármacos inibidores de folatos	33
1.1.3. Peróxidos	33
1.2.SYBR Green® I	34
2. Comparação entre métodos	35
3. Vantagens da deteção de hemozoína por citometria de fluxo	36
Conclusão	37
Referências	38

Introdução

1. Malária

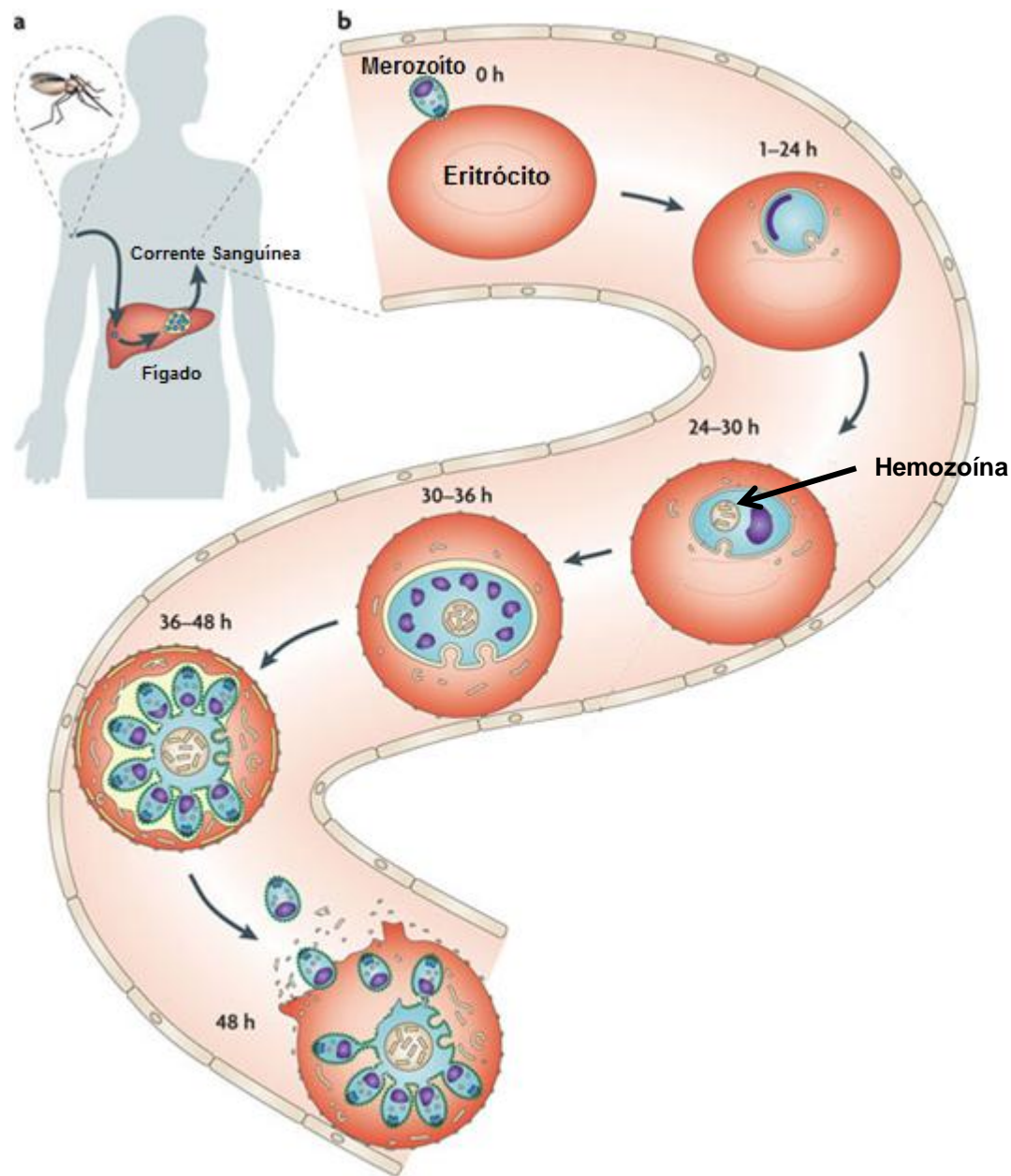
1.1. Panorama atual

De acordo com o Relatório Mundial sobre a Malária de 2011, divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), registaram-se 216 milhões de casos de malária em 2010 e estimou-se um número de 655 mil mortes, sendo as crianças africanas as principais vítimas. Atualmente, metade da população mundial reside em áreas com risco de transmissão de malária (99 países e territórios) ¹.

1.2. Ciclo de vida do agente causal

A malária é causada por parasitas do género *Plasmodium*. Existem 5 espécies de *Plasmodium* capazes de infectar os humanos, nomeadamente *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium malariae*; *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, que são transmitidos através da picada de um mosquito do género *Anopheles*.

O ciclo de vida do parasita inicia-se quando o mosquito injeta esporozoítos no corpo humano no momento da picada. Uma vez no sangue, os esporozoítos dirigem-se para o fígado, onde penetram nos hepatócitos e multiplicam-se. Com a lise destas células, há a libertação dos merozoítos para a corrente sanguínea que vão invadir os eritrócitos. Dentro do eritrócito os parasitas maturam durante 48 horas (no caso de *P. falciparum*), onde passam por vários estádios, nomeadamente trofozoítos e esquizontes. Os parasitas mais maduros (esquizontes) vão acabar por lisar o eritrócito e libertar merozoítos que irão invadir novos eritrócitos. Alguns dos parasitas não se desenvolvem em esquizontes, mas sim em gametócitos, que são as formas responsáveis pela transmissão ao mosquito vector. No Mosquito o parasita passa por diferentes fases de diferenciação e acaba nas glândulas salivares em forma de esporozoíto, pronto para iniciar um novo ciclo de infecção².



Nature Reviews | Microbiology

Figura 1: Ciclo de vida do parasita. **a)** A Malária é causada pelo parasita *Plasmodium*, que é transmitido através da picada de um mosquito infectado. No corpo humano, o parasita primeiro multiplica-se no fígado e depois passa para a corrente sanguínea, onde infecta os eritrócitos. **b)** Dentro dos eritrócitos, o parasita possui um ciclo de 48 horas. Às 0h os merozoítos invadem o eritrócito; seguido pelo estágio em anel (1-24h), durante o estágio de trofozoíto há a replicação do DNA e crescimento do parasita (24-36h), e por fim o estágio de esquizonte (36-48h) em que são formados os merozoítos que infectam novos eritrócitos. Uma pequena percentagem de parasitas diferencia-se em gametócitos (não ilustrado), que podem ser ingeridos pelo mosquito enquanto se alimenta de sangue humano. (Adaptado de Goldberg et al 2010)³.

Dentro dos eritrócitos, o parasita degrada a hemoglobina. Durante o processo de degradação forma-se heme livre e este produto é tóxico para o parasita. Por conseguinte, no vacúolo digestivo do parasita ocorre um processo de destoxificação por polimerização, sendo o heme transformado em cristais de hemozoína⁴. O tamanho dos cristais de hemozoína depende do estágio de desenvolvimento do parasita, sendo a menor quantidade detetada nos trofozoítos e a maior quantidade detetada em esquizontes.

Na figura 2 está ilustrado o ciclo de vida de *P. falciparum* no eritrócito e o aumento associado do conteúdo em hemozoína. É possível também observar o aparecimento dos cristais de hemozoína como inclusões acastanhadas, nas imagens microscópicas dos eritrócitos parasitados⁵.

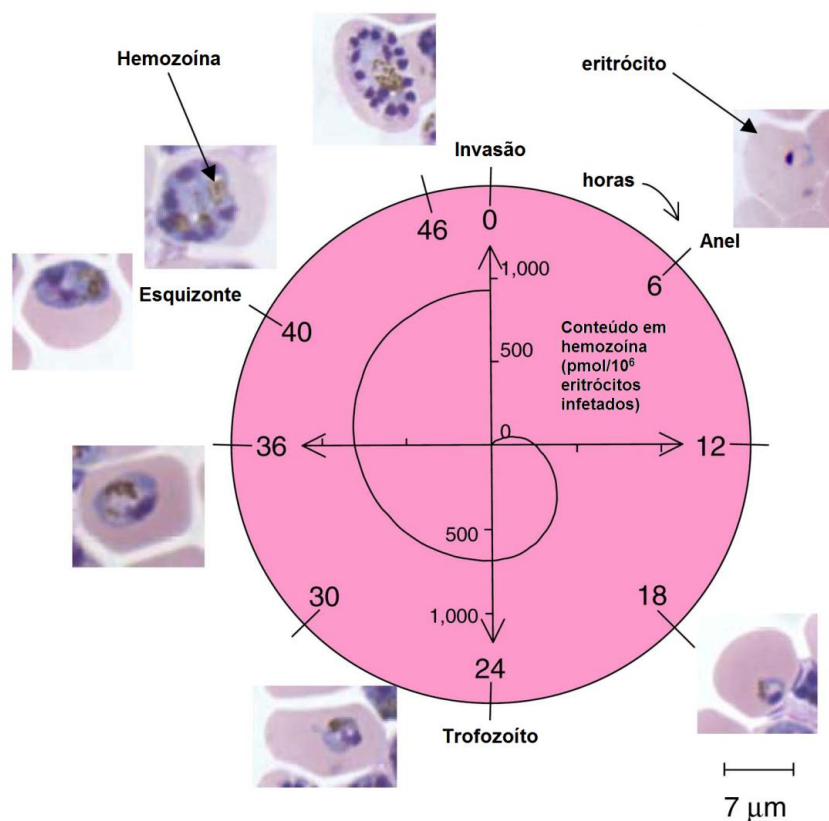


Figura 2: Ciclo de vida eritrocitário do parasita *Plasmodium falciparum*. Relação entre o conteúdo em hemozoína e o estágio de desenvolvimento do parasita. (adaptado de Moore *et al* 2006⁵)

1.3. Tratamento

O objetivo primário do tratamento da malária é garantir a eliminação rápida e completa do parasita, no sangue do doente. O objetivo do tratamento em termos de saúde pública é de reduzir a transmissão da infecção, ou seja, de reduzir o reservatório

infecioso e prevenir o aparecimento e propagação da resistência aos fármacos antimaláricos. Com esse objetivo, a OMS recomenda, atualmente, o tratamento de casos confirmados de Malária com terapias combinadas com artemisinina (ACT - “*Artemisinin Combination Therapy*”), de qualidade assegurada, por se tratar da melhor terapia disponível para curar a doença causada por *Plasmodium falciparum*, a espécie de *Plasmodium* mais letal⁶.

A artemisinina e derivados são usados em combinação com outros antimaláricos, por possuírem um modo de ação rápido e serem rapidamente eliminados do organismo. Desta forma, outros antimaláricos com um tempo de semi-vida maior são utilizados em combinação para eliminar os parasitas residuais. Além disso, é menor a probabilidade de surgir uma mutação que produz resistência simultânea aos dois fármacos com modos de ação distintos⁷.

1.4. História dos fármacos antimaláricos

A malária é uma doença antiga e existem referências a febres periódicas características desta doença, desde o ano 2700 a.C.⁸.

No século XVII, os Jesuítas espanhóis aprenderam com as tribos indígenas do Peru, as propriedades medicinais da casca de uma árvore peruana (Cinchona) e trouxeram para a Europa a casca dessa árvore, que serviu como o primeiro medicamento contra as febres periódicas que eram prevalentes no continente. O composto ativo, hoje conhecido como o antimalárico quinina, foi isolado em 1820 por químicos franceses⁹.

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), as tropas americanas ficaram sem acesso à quinina e o número de vítimas da doença aumentou. Desta forma, os Estados Unidos da América remeteram este problema a uma grande equipa de investigação, que acabou por surgir com uma solução – a cloroquina – que havia sido inventada na Alemanha em 1934 por Hans Andersag¹⁰. A cloroquina foi utilizada como antimalárico até que surgiu a resistência do parasita ao composto em finais dos anos 50¹¹. E assim prosseguiu a busca por novos antimaláricos - os EUA desenvolveram a pirimetamina e mefloquina enquanto a artemisinina foi purificada na China. O valor medicinal da planta Qinghao (*Artemisia*) já havia sido descrito por Ge Hong no século IV, mas o composto ativo só foi isolado no início dos anos 70, através de um projeto secreto que surgiu da necessidade do governo Chinês tratar as suas tropas que se encontravam em combate na guerra do Vietnam¹². Os derivados deste extrato, conhecidos como artemisininas, são atualmente os antimaláricos mais potentes e eficazes, especialmente em combinação com outros fármacos⁶.

1.5. Principais fármacos antimaláricos

Os principais fármacos esquizonticidas sanguíneos utilizados no tratamento da malária são eficazes contra as formas eritrocitárias do parasita e podem ser agrupados em classes:

- os inibidores de hemozoína, tais como as metanolquinolinas (quinina, mefloquina), as 4-aminoquinolas (cloroquina) e a lumefantrina.
- os antifolatos, que interferem na síntese ou na ação do ácido fólico (sulfadoxina, pirimetamina),
- endoperóxidos (artemisinina e derivados)¹³.

O principal modo de ação das quinolinas parece estar relacionado com a acumulação destas bases fracas no vacúolo digestivo ácido do parasita e à ligação à ferriprotoporfirina-IX, inibindo o mecanismo de destoxificação do parasita, através do qual ele converte a ferriprotoporfirina-IX (um subproduto tóxico da degradação da hemoglobina) em hemozoína (um polímero não tóxico). A consequente acumulação de ferriprotoporfirina-IX dentro do vacúolo digestivo leva à morte do parasita^{14,15}.

Os fármacos considerados pertencentes à classe de inibidores de folatos, inibem enzimas da via biossintética dos folatos que resulta na diminuição da síntese de pirimidinas. Um exemplo deste tipo de fármaco é a pirimetamina, que funciona como inibidor da dihidrofolato redutase (DHFR) do plasmódio, bloqueando a biossíntese de purinas e pirimidinas, que são essenciais para a síntese de DNA e multiplicação celular. Isto conduz a uma falha de divisão nuclear, no momento da formação do esquizonte nos eritrócitos e fígado. O modo de ação da sulfadoxina é semelhante ao da pirimetamina, mas este atua inibindo a dihidropteroato sintetase (DHPS)^{16,17}.

O mecanismo de ação das artemisininas ainda não foi completamente esclarecido, mas vários estudos mostram que a ponte de endoperóxido das artemisininas pode ser clivada pela redução com o íon ferroso presente no grupo heme da hemoglobina ou de origem exógena. Esta clivagem forma um ou mais radicais livres que podem alquilar ou modificar covalentemente proteínas dos parasitas¹⁸. Outras evidências indicam que o mecanismo de ação é semelhante ao das quinolinas, onde os fármacos acumulam-se no vacúolo digestivo do parasita e interferem na formação da hemozoína¹⁹.

1.6. Resistências

A resistência aos fármacos antimaláricos é definida pela OMS, como a capacidade de uma estirpe do parasita de sobreviver e/ou multiplicar-se, apesar da administração e absorção de um fármaco antimalárico na dose normalmente recomendada²⁰.

Uma ameaça eminente ao controlo da malária é o surgimento de parasitas resistentes aos fármacos antimaláricos. A resistência tem sido documentada em todas as classes de antimaláricos, incluindo a artemisinina.

Em finais dos anos 50, surgem focos de resistência à cloroquina na Colômbia e na fronteira Camboja-Tailândia. A terapia baseada em pirimetamina/sulfadoxina foi introduzida em meados dos anos 60, e rapidamente surgiu a resistência na fronteira Camboja-Tailândia. Nesta região também já foram registados casos de resistência a outros fármacos, tais como, a quinina em meados dos anos 60 e a mefloquina nos anos 80²¹.

A OMS em 2005, através do relatório “WHO report on *Susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs*”, começou a chamar a atenção para o perigo de resistência à artemisinina. Existem referências de resistência à artemisinina em *Plasmodium falciparum*, na fronteira Camboja-Tailândia²²⁻²⁴.

O aparecimento de resistência resulta de alterações genéticas que produzem mutações espontâneas dando origem a estirpes resistentes do parasita. Num meio contendo fármaco em doses subterapêuticas, os parasitas susceptíveis são eliminados e o parasita resistente sofre um processo de seleção, passando a ser transmitido e havendo assim a propagação de resistência⁶.

São vários os fatores que levam à resistência, ou seja, considera-se que resulta de uma interação dos padrões de uso dos medicamentos, das características intrínsecas do fármaco, da imunidade do hospedeiro e das características do parasita, do vetor e do meio ambiente²¹. Mas a pressão dos fármacos, tem sido identificada como o principal fator, isto é, a seleção de estirpes resistentes pode acontecer com o uso inadequado do fármaco ou quando é utilizado extensivamente como monoterapia²⁵.

1.7. Mecanismos de resistência

A resistência aos fármacos antimaláricos é geralmente um resultado de alterações na acumulação ou efluxo do fármaco (resistência à cloroquina, amodiaquina, quinina, mefloquina, halofantrina), ou da redução da afinidade do fármaco em relação ao alvo,

resultante de mutações pontuais nos genes que codificam o alvo (a resistência à pirimetamina, cicloguanilo, sulfonamida) ²⁶.

Os mecanismos bioquímicos da resistência estão melhor descritos para a cloroquina e para a combinação de antifolatos.

A análise por abordagens moleculares demonstrou que a redução da concentração de cloroquina intracelular no vacúolo digestivo do parasita é uma característica comum de estirpes resistentes. Este fenótipo está correlacionado com a presença de mutações nos genes que codificam para transportadores membranares no parasita, tais como, o gene *pfcr1* que codifica uma proteína denominada por “*cloroquine resistance transporter*” (PfCRT) e o gene *pfmdr1* que codifica a proteína “*multidrug resistance*” (PfMDR1). A resistência à pirimetamina e sulfadoxina surgiu pela acumulação de mutações nos genes *dhfr* e *dhps*. Ou seja, a resistência aos inibidores das proteínas DHFR (que é codificada pelo gene *dhfr*) e DHPS (codificada pelo gene *dhps*) é conferida por mutações nos genes que codificam para as respectivas enzimas ^{13,17}.

A resistência às artemisininas é um tema atual e em debate. De facto, o primeiro relatório da sua possível existência é muito recente (Dondorp 2009)⁴⁶, onde esta resistência é definida por um aumento do tempo de “*clearance*” do parasita. Neste estudo, Dondorp *et al* documentaram tempos prolongados de “*clearance*” da parasitemia de 84 horas em Pailin no Camboja ocidental, em comparação com o tempo médio de “*clearance*” de 48 horas na fronteira ocidental da Tailândia.

O fenótipo resistente detetado no oeste do Camboja não está relacionado com qualquer polimorfismo nos marcadores estabelecidos de resistência aos fármacos. Curiosamente, ao realizarem-se testes de sensibilidade *in vitro* com os parasitas que possuem um tempo de “*clearance*” mais lento *in vivo*, foram obtidos resultados que praticamente não revelaram nenhuma alteração do IC₅₀ (concentração de inibição de 50%) *in vitro*²⁷. Portanto, os testes *in vitro* disponíveis atualmente parecem não ser capazes de detetar esta resistência.

Assim, ainda não são conhecidos os mecanismos de resistência à artemisinina e, conseqüentemente, não estão disponíveis marcadores moleculares específicos para a detecção da resistência à artemisinina.

1.8. Implicações/Consequências da resistência

Plasmodium falciparum já desenvolveu resistência a quase todos os antimaláricos disponíveis e o desenvolvimento de novos antimaláricos é um processo mais moroso do que o desenvolvimento de resistência pelo parasita. A resistência disseminada à cloroquina é particularmente preocupante em África, visto existirem poucas alternativas à mesma que sejam seguras e economicamente acessíveis. A artemisinina é a última alternativa segura à terapia e o surgimento de resistência a este composto seria uma ameaça não só para a eliminação da malária, como aumentaria o índice de mortalidade infantil em África²⁸.

1.9. Deteção de resistência

Existem vários métodos de monitorização da resistência aos fármacos antimaláricos que incluem testes *in vivo* e *in vitro* e, mais recentemente, os marcadores moleculares. O primeiro protocolo para monitorizar a eficácia dos fármacos antimaláricos *in vivo* foi formulado por um grupo científico da OMS, em 1964.

Os testes *in vivo* consistem no tratamento, com concentrações de fármaco conhecidas, de um grupo de indivíduos parasitados e sintomáticos. O protocolo sofreu alterações ao longo dos anos, baseando-se atualmente no acompanhamento dos doentes por um período de 28 dias ou até 42 dias quando são aplicados medicamentos com maiores tempos de semi-vida.

A longa duração do teste é uma condição desvantajosa, uma vez que dificulta o acompanhamento do doente²⁹.

O método de cultura contínua de *Plasmodium falciparum*, desenvolvido por Trager e Jensen em 1976, permitiu que surgissem alternativas ao teste *in vivo*³⁰.

Surgem então os testes da sensibilidade de parasitas da malária *in vitro*. Estes permitem uma exclusão quase completa de fatores relacionados com o hospedeiro, tais como, a imunidade do hospedeiro ou diferenças na absorção e metabolismo do fármaco. Os resultados dos testes *in vitro* proporcionam uma compreensão mais objetiva da sensibilidade ao fármaco (os resultados são quantitativos), não oferecem risco para o doente e podem ser aplicados para a avaliação da atividade antimalárica de novos compostos³¹.

Os ensaios *in vitro* baseiam-se na inibição do crescimento e desenvolvimento de parasitas da malária sob diferentes concentrações de um determinado fármaco por comparação ao controlo sem fármaco. O microteste *in vitro* da OMS baseia-se na

contagem dos parasitas que se desenvolvem em esquizontes, enquanto que o ensaio isotópico baseia-se na medição da quantidade de hipoxantina radiomarcada, um precursor do DNA que é incorporado nos parasitas. Existem outros testes colorimétricos que permitem testar parasitêmias: o ensaio enzimático da lactato desidrogenase do parasita (pLDH), o ensaio baseado em ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) da lactato desidrogenase do parasita e o ensaio da proteína rica em histidina II (HRP II).

Tabela 1: Comparação entre os testes mais comuns de sensibilidade *in vitro* de *Plasmodium falciparum* *

	Microteste da OMS	Ensaio isotópico	Ensaio enzimático pLDH	Ensaio do HRP II
Parasitêmia mínima inicial	Reduzida	Moderada	Elevada	Reduzida
Tempo de cultura	24 - 30 h	48 h (até 72 h)	48 h	48 - 72 h
Avaliação da inibição do crescimento	Microscopia (maturação do esquizonte)	Incorporação de precursores radiomarcados	Atividade enzimática de pLDH	ELISA
Necessidades em equipamento	Reduzidas (microscópio)	Elevadas (contador de cintilação)	Moderada (leitor de microplacas)	Moderada (leitor de microplacas de ELISA)
Quantidade de trabalho envolvida	Elevada	Reduzida	Reduzida	Reduzida

*(adaptado de Noedl, 2003)³¹

Atualmente, a resistência aos fármacos pode também ser confirmada através de técnicas moleculares. Os métodos moleculares para monitorização de resistências baseiam-se na identificação de mutações genéticas relacionadas com a resistência ao fármaco antimalárico no genoma do parasita. São polimorfismos em determinados genes de *Plasmodium falciparum* (*pfcr1*, *pfmdr1*, *dhfr* e *dhps*) que originam a resistência aos fármacos (como descrito em 1.7) e que são detetados por *polymerase chain reaction*.

Este método exhibe vantagens em relação aos métodos *in vitro*, tais como, a possibilidade de se analisar vários isolados num curto espaço de tempo e as amostras poderem ser coletadas em papel de filtro, o que facilita o transporte e armazenamento^{29,31}.

Contudo, os testes *in vitro* e moleculares também possuem limitações.

O microteste da OMS trata-se de um ensaio extremamente trabalhoso, uma vez que exige a contagem microscópica de esquizontes em lâminas de gota espessa, logo,

requer pessoal altamente qualificado de forma a diminuir a variabilidade na contagem dos parasitas³¹.

O ensaio isotópico possui como desvantagens a necessidade de equipamento mais dispendioso e a manipulação de material radioativo, que requer um sistema de desperdícios e cuidados de manipulação especiais. Apesar do ensaio isotópico ser considerado o método de referência para os testes de sensibilidade, dificilmente é aplicável em países onde a malária é endêmica^{31,32}.

Para os ensaios enzimáticos e baseados em ELISA, há a necessidade de reagentes que acabam por tornar o teste dispendioso, para além de requerem muito tempo para a obtenção do resultado³³.

Quanto aos métodos moleculares, a principal desvantagem é o fato dos marcadores moleculares de resistência do *P. falciparum* estarem somente disponíveis para um número limitado de fármacos: cloroquina, pirimetamina, cicloguanilo, sulfadoxina e atovaquona. Mais pesquisas serão necessárias para se identificarem os genes envolvidos na resistência a outros fármacos, em particular à artemisinina^{29,31}.

1.10. Citometria de fluxo

O uso da citometria de fluxo, juntamente com a utilização de fluoróforos específicos de DNA, tem sido descrito como uma técnica alternativa aos testes de sensibilidade aos antimaláricos, uma vez que permite obter resultados quantitativos, mais rápidos e reprodutíveis³⁴.

A citometria de fluxo pode ser usada para a identificação de determinadas células em suspensão, permitindo a sua diferenciação relativamente ao tamanho, granularidade, intensidade de fluorescência e ainda pela despolarização, possuindo a vantagem de fornecer mais informações sobre o crescimento e desenvolvimento do parasita da malária do que qualquer outro método atualmente disponível³⁵.

Em citometria de fluxo, os eritrócitos (marcados ou não com um corante fluorescente) passam por um feixe de luz, que origina a dispersão de luz e a emissão de fluorescência.

1.10.1. *Forward scatter e side scatter*

Os eritrócitos em suspensão fluem célula a célula e vão passando através do feixe de luz que consequentemente é dispersado em diferentes ângulos. Os detetores vão receber a luz que sofre dispersão na direção frontal (*forward scatter* ou FSC) e a luz que é desviada (*side scatter* ou SSC) pela célula. A luz dispersada revela informações sobre a dimensão celular com o FSC e a granularidade da célula com o SSC³⁶.

1.10.2. Fluorescência

Os corantes fluorescentes constituem uma ferramenta adicional para o estudo de uma população celular. O feixe de luz também excita fluorocromos, que absorvem a luz do laser e emitem fluorescência a comprimentos de onda mais longos.

Para analisar o crescimento do parasita, neste estudo utilizou-se o corante SYBR® Green I por se tratar de um agente intercalante (permeável à membrana), fluorescente quando ligado ao DNA em cadeia dupla³⁷.

O complexo DNA-SYBR Green apresenta um pico de absorção a 498 nm e um pico de emissão de fluorescência a 522 nm, que corresponde à zona verde do espectro (ver figura 3).

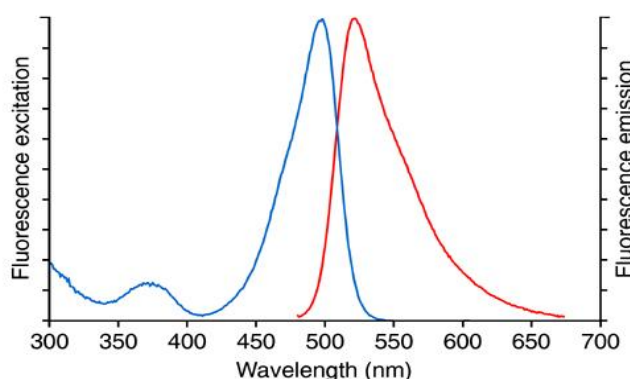


Figura 3: Espectro de excitação e emissão de fluorescência do corante SYBR® Green ligado ao DNA. (adaptado de Molecular Probes, 2006)³⁸

1.10.3. Detecção do pigmento malárico por citometria de fluxo

Quando a hemoglobina é degradada pelo parasita, liberta-se heme e por este composto ser tóxico, o parasita transforma-o em hemozoína. A hemozoína é um cristal birrefringente, ou seja, é capaz de desviar um plano de luz polarizada. Esta propriedade da hemozoína foi utilizada pela primeira vez no diagnóstico de malária por citometria, através da detecção da despolarização em leucócitos de doentes infectados³⁹.

No seguimento desse estudo, um outro foi efetuado em modelos animais (ratinhos infetados com *Plasmodium berghei*) e demonstrou-se que a deteção de hemozoína por citometria pode estabelecer a base de um teste de sensibilidade, uma vez que, a presença de hemozoína no interior dos parasitas que infetam eritrócitos, pode ser detetada por citometria de fluxo. Isto permite detetar eritrócitos infetados e diferenciar os estádios de maturação do parasita⁴⁰.

Portanto, uma nova etapa do estudo passa por desenvolver um método que seja aplicável à pesquisa de sensibilidade aos fármacos antimaláricos em humanos.

Objetivo

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um teste de sensibilidade alternativo para *Plasmodium falciparum*, com base na deteção por citometria de fluxo de hemozoína em eritrócitos infetados.

Neste sentido, dando sequência à pesquisa preliminar realizada em modelos animais (ratinhos), a fase seguinte contempla a extensão do estudo a espécies de *Plasmodium* responsáveis por infeções em humanos. Para tal, pretende-se avaliar o efeito inibitório de diferentes fármacos antimaláricos em culturas contínuas de *Plasmodium falciparum*, através da deteção de eritrócitos infetados com parasitas contendo hemozoína.

Material e Métodos

1. Soluções

O meio utilizado na cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum* é denominado de *Malaria Complete parasite Medium* (MCM). A 500 mL do meio comercial líquido RPMI 1640 (Life Technologies, Madrid, Espanha) são adicionados 12 mL de tampão HEPES 1M (Life Technologies, Madrid, Espanha), 5 mL de L-glutamina 200 mM (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), 500 µL de Gentamicina 500 mg/ml (Invitrogen, Madrid, Espanha) e 50 mL de solução de Albumax 10x (Life Technologies, Madrid, Espanha). A solução de Albumax 10x é preparada num volume final de 500 mL onde se dissolvem 2,98 g de HEPES (VWR, Carnaxide, Portugal), 1,67 g de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), 1 g de glicose (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), 0,1 g de hipoxantina (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) e 25 g de ALBUMAX II (Life Technologies, Madrid, Espanha), com pH ajustado a 7,2-7,4 e esterilizada por filtração (filtro com poro de 0,22 µm).

PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline* – 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄) é a solução utilizada para diluir as amostras antes da sua análise no citómetro de fluxo. Esta solução é feita a partir de uma diluição de 1:10 da solução comercial PBS 10x (Life Technologies, Madrid, Espanha).

2. Estirpes de *Plasmodium falciparum*

Para este estudo usaram-se duas estirpes de *Plasmodium falciparum* adaptadas a culturas contínuas: uma estirpe sensível a todos os fármacos (3D7) e uma resistente à cloroquina (Dd2). Ambas as estirpes foram obtidas a partir do *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* (MR4).

2.1. Cultura de *Plasmodium falciparum* na fase eritrocitária assexuada

Culturas contínuas das estirpes de *P. falciparum* acima referidas (3D7 e Dd2) foram estabelecidas para, posteriormente, serem utilizadas nos testes de sensibilidade aos antimaláricos. Para isso, amostras de eritrócitos infetados com *P. falciparum*, previamente congeladas a -80 °C, foram descongeladas à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma lavagem desses eritrócitos com soluções de NaCl a 12% e 1,6% (onde ficam retidos os resíduos da solução crioprotectora). De seguida, fez-se outra lavagem com RPMI. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se eritrócitos não

infetados até perfazer um volume final de 0.5 mL de eritrócitos. Ressuspendeu-se o volume final de eritrócitos em 9.5 ml de meio MCM para que o hematócrito final da cultura ficasse a 5 %. Transferiu-se a suspensão para um frasco de cultura de 25 cm² e colocou-se a incubar a 37°C e a uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Os eritrócitos não infetados, provenientes de um dador saudável, foram fornecidos pelo Instituto Português do Sangue. Estes são lavados três vezes com RPMI antes de serem usados e são armazenados a 4 °C por um período máximo de 7 dias.

As culturas contínuas de *P. falciparum* foram mantidas a parasitémias (percentagem de eritrócitos infetados) inferiores a 2% e a um hematócrito de 5%. O meio de cultura foi substituído diariamente.

Para avaliar o crescimento da cultura foram calculadas diariamente as respetivas parasitémias. Para isso esfregaços de sangue foram corados pelo método de coloração de Giemsa. O esfregaço depois de seco foi fixado em metanol a 100% (Merck, Lisboa, Portugal) e corado durante 20 minutos com solução de Giemsa (Merck, Lisboa, Portugal) diluída 10 vezes em PBS 1x. A parasitémia foi calculada num microscópio óptico (ampliação 1000X): nº de eritrócitos infectados/nº de eritrócitos totais, em 10 campos (o resultado é expresso em %).

2.2. Sincronização da cultura

Para obter um predomínio de formas jovens na cultura contínua, recorreu-se ao protocolo de sincronização utilizando uma solução de D-sorbitol (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) a 5%. Aos eritrócitos infetados que se encontravam em cultura (que correspondem a 0.5 mL de uma cultura de 10 mL) foram adicionados 10 mL de sorbitol a 5%. Incubou-se, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Depois fizeram-se duas lavagens com RPMI 1640, centrifugando a suspensão a 1800 rpm durante 5 minutos. Após as lavagens, o volume de eritrócitos foi medido e transferido para um frasco de cultura com 9.5 mL de MCM. Visto que este procedimento lisa os eritrócitos infetados com parasitas mais maduros, por vezes foi necessário adicionar eritrócitos não infetados para que o volume final de eritrócitos fosse de 0.5 mL e, consequentemente, para que o hematócrito se mantivesse a 5%.

3. Testes de sensibilidade

Neste trabalho, utilizaram-se culturas sincronizadas na fase de trofozoíto imaturo das estirpes 3D7 e Dd2 de *P. falciparum* e testou-se a sensibilidade destas duas estirpes a

diferentes antimaláricos. O crescimento do parasita foi monitorizado por citometria de fluxo, através da deteção da despolarização (deteção da hemozoína) e deteção da fluorescência emitida (DNA marcado com SYBR® Green). Os resultados obtidos foram comparados com o método de referência baseado no teste ELISA HRP II (*Histidine Rich Protein II*).

3.1. Preparação dos fármacos

Soluções aquosas foram preparadas a partir dos fármacos em pó. Os antimaláricos utilizados para os testes foram: cloroquina difosfato, dicloridrato de quinina, pirimetamina, artemisinina, artesunato, dihidroartemisinina (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) mefloquina (Roche, Amadora, Portugal) e lumefantrina (Novartis, Sintra, Portugal). Para preparar as soluções stock, a cloroquina foi solubilizada em água, o artesunato em etanol a 70%, a pirimetamina e lumefantrina em etanol absoluto, a quinina, artemisinina e a dihidroartemisinina em metanol puro. Prepararam-se soluções intermediárias e a partir destas obtiveram-se as soluções de trabalho, através de diluições seriadas da respetiva solução intermediária em meio MCM. As soluções de trabalho foram preparadas com o dobro da concentração das concentrações finais pretendidas.

As concentrações finais de cada um dos fármacos foram:

- Cloroquina – 6; 12; 25; 50; 100; 200 nM
- Quinina – 3; 12; 50; 200; 800 nM
- Mefloquina – 10; 20; 40; 80; 160 nM
- Lumefantrina – 1,25; 5; 20; 80 nM
- Pirimetamina – 12; 25; 50; 100; 200 nM
- Artemisinina – 4; 8; 16; 32; 64 nM
- Artesunato – 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 nM
- Dihidroartemisinina – 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 nM

3.2. Ajuste das condições de cultura

Para a realização dos testes de sensibilidade por citometria de fluxo, foram definidas como condições iniciais de crescimento *in vitro*, 1% parasitémia e 2,5% de hematócrito. As culturas foram previamente sincronizadas (como descrito no ponto 2.2), sendo que só as formas mais jovens do parasita estavam presentes.

3.3. Teste de sensibilidade *in vitro* baseado na detecção de hemozoína por citometria

3.3.1. Equipamento

As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo CyFlow® SL (Partec, Münster, Alemanha) equipado com um laser azul de 488 nm, detetores *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC 1v), fluorescência verde FL1 (527/30 *Band Pass*) e fluorescência vermelha FL3 (630 nm *Long Pass*).

Uma das propriedades da luz laser é a polarização vertical (v), ou seja, no feixe do laser emitido, as ondas propagam-se paralelas a um mesmo plano vertical. A luz verticalmente polarizada propaga-se através de um filtro de polarização vertical e é detetada em SSC 1v.

Os eritrócitos infectados com parasitas contêm hemozoína e uma vez que a hemozoína é um cristal que possui a propriedade de refratar a luz incidente, a propagação das ondas passa a ser horizontal (sofrem um desvio angular de 90°). Portanto, foi adaptado um segundo filtro de polarização horizontal (h) que permite detetar o SSC despolarizado (SSC 2h), utilizado para detetar a luz que se propaga horizontalmente.

Para tal, utilizou-se um “*beam splitter*” que reflete 50% da luz transmitida para um filtro polarizador horizontal que foi colocado perpendicularmente à direção de polarização da luz vinda da fonte.

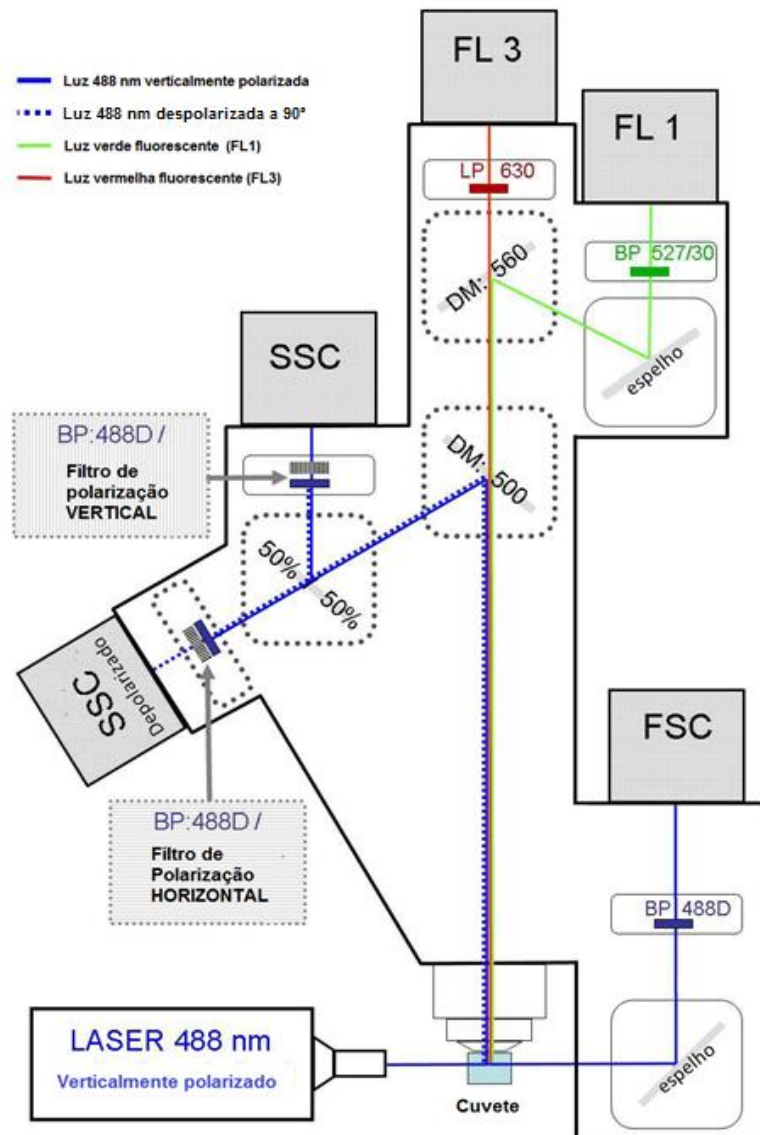


Figura 4: Configuração óptica do citômetro para permitir a detecção da despolarização. Permite a detecção de tamanho (FSC), granularidade (SSC 1v), fluorescência verde (FL1), fluorescência vermelha (FL3) e despolarização (SSC 2h). DM = espelho dicróico; BP = filtro *bandpass*; LP = filtro *longpass*. (Adaptado de Frita *et al.* 2011)⁴⁰.

3.3.2. Ensaio

Para o ensaio, centrifugou-se a cultura, removeu-se o sobrenadante e fez-se uma diluição dos eritrócitos (1:20) em MCM, para ajustar o hematócrito a 5%. Adicionou-se então à microplaca de 24 poços (VWR, Carnaxide, Portugal), iguais volumes de suspensão de sangue da cultura sincronizada e suspensão dos diversos antimaláricos com diferentes concentrações (cada concentração é testada em triplicado). Colocou-se a microplaca a incubar a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂, durante 48 horas (ciclo de vida do parasita). Em alguns casos a incubação prolongou-se até às 72 horas.

Nesse período foram efetuadas medições no citómetro de fluxo em intervalos de 6 horas. Para cada medição, 5 µL da amostra presente nos poços foi corada com SYBR® Green I 1x (Molecular Probes, Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) e posteriormente ressuspendeu-se em 900 µL de PBS 1x e analisaram-se as amostras no citómetro de fluxo.

3.3.3. Monitorização da parasitémia através da deteção de fluorescência por citometria – SYBR® Green I

Para identificar os eritrócitos infetados usou-se o SYBR® Green I, de modo a marcar o DNA do parasita.

Fez-se uma diluição de 1:10 000 da solução *stock* de SYBR® green I em PBS a 1x. As amostras dos poços foram incubadas durante 20 minutos antes de cada aquisição no citómetro, como descrito anteriormente.

3.4. Teste de sensibilidade baseado no ensaio de HRP II

3.4.1. Revestimento das placas com anticorpo primário

O primeiro passo foi revestir placas de ELISA de 96 poços do tipo “*high binding*” (VWR, Carnaxide, Portugal) com 100 µL de uma solução a 1,0 µg/mL do anticorpo primário IgM anti-HRP II (MPFM-55A, Immunology Consultants Laboratories, Newberg, OR, USA) e incubou-se a 4°C durante a noite. Descartou-se o conteúdo da placa, adicionou-se 200 uL de solução de bloqueio por poço, que consiste numa solução de albumina de soro bovino a 2% (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) em PBS 1x, incubou-se à temperatura ambiente durante 2 horas, descartou-se e secou-se a placa. Após a incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de PBS-Tween [0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) em PBS]. Selaram-se hermeticamente as placas em sacos plásticos e congelou-se a -20°C.

3.4.2. Realização de ELISA-HRP II

Suspensões de sangue infetado, com uma parasitémia de 0,05% e um hematócrito de 1,5%, foram incubadas com os diferentes fármacos durante 72 horas, numa placa de 96 poços (VWR, Carnaxide, Portugal). Ao fim deste tempo, congelou-se e descongelou-se duas vezes a placa de forma a obter uma hemólise completa. Depois,

100 μ L de cada lisado foram transferidos para as placas previamente revestidas com anticorpo primário. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de PBS-Tween. Após as lavagens, adicionou-se 100 μ L do anticorpo conjugado MPFG-55P (Immunology Consultants Laboratories, Portland, OR, E.U.A.) a cada poço, as placas foram incubadas durante uma hora e lavadas três vezes com solução PBS-Tween. Finalmente, adicionou-se a cada poço, 100 μ L da solução cromogénica Tetrametilbenzidina (Biotrend, Cantanhede, Portugal) e incubou-se no escuro durante 5 a 10 minutos. As reacções foram paradas com ácido sulfúrico (VWR, Carnaxide, Portugal) 1 M. Fez-se a leitura das absorvâncias das placas a 450 nM, utilizando o leitor de placas de ELISA Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Suíça)³³.

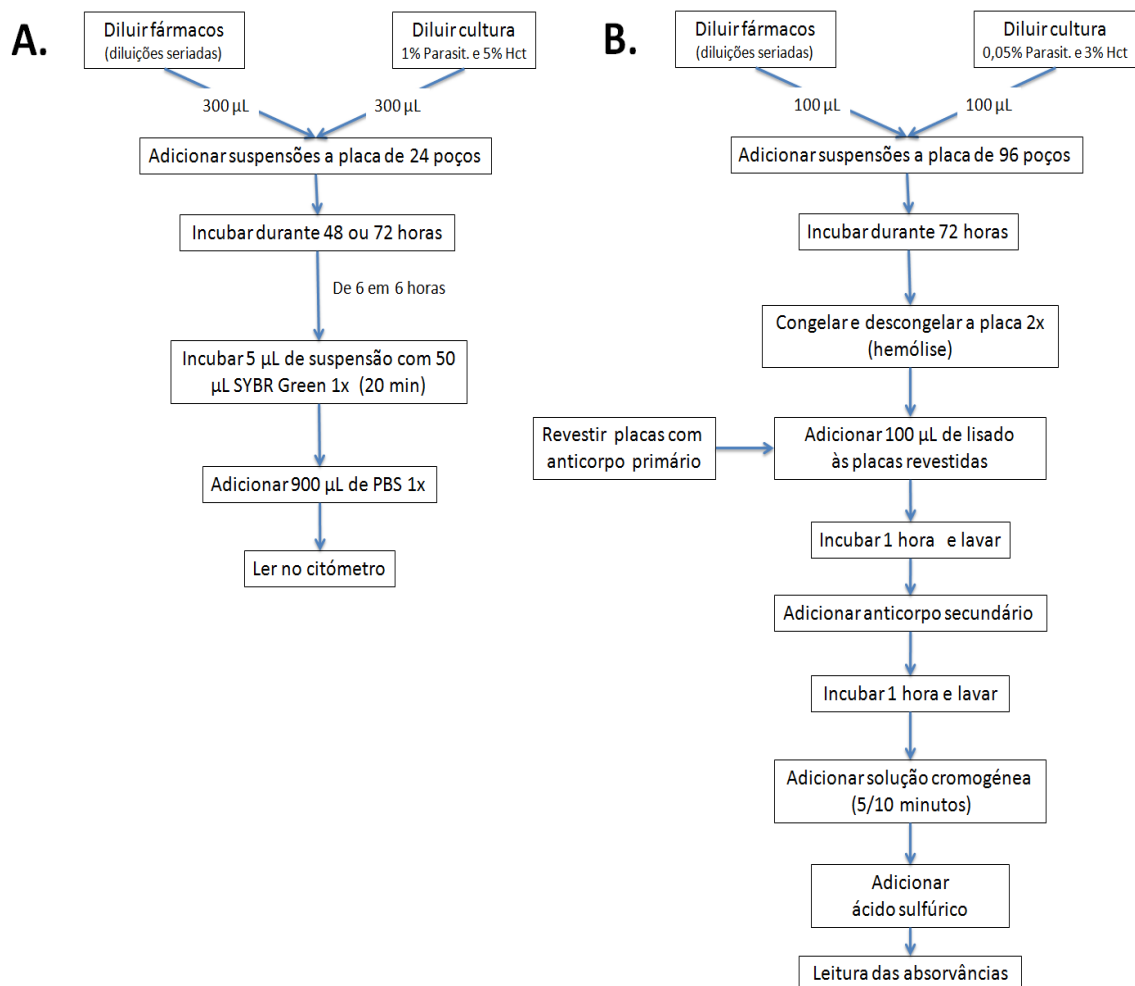


Figura 5: Diagramas dos procedimentos para a realização dos ensaios baseados na deteção de hemozoína por citometria de fluxo (A) e no método de ELISA-HRP II (B).

3.5. Análise de resultados

3.5.1. Análise de resultados no software FlowJo

Os resultados da citometria de fluxo foram analisados com o programa FlowJo 9.5.2 (Tree Star Inc. Ashland, OR). A população de eritrócitos de interesse foi selecionada pelo tamanho (FSC) e granularidade (SSC) característicos. A partir desta população selecionou-se a subpopulação de células que despolarizam (através da análise do SSC normal *versus* SSC despolarizado) e a subpopulação de células com fluorescência. Para cada ensaio foram incluídos controlos negativo (eritrócitos não parasitados) e positivo (ausência de fármaco).

3.5.2. Cálculo do IC₅₀

A sensibilidade ao fármaco foi expressa como a concentração de fármaco que resultou numa inibição de 50% do crescimento do parasita (IC₅₀), ou seja, uma inibição de 50% em comparação com os poços de controlo sem o fármaco e foi determinado graficamente por interpolação logarítmica de curvas sigmoidais de dose-resposta. Para tal foi utilizado o programa Sigma-Plot 11.0.

4. Ética

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, que emitiu um parecer favorável no dia 3 de Março de 2010.

Resultados

1. Citometria de fluxo

Para analisar os resultados foi necessário adotar uma estratégia de seleção de janelas (*gates*) que incluíram os eventos de interesse. A figura 6 representa a sequência de *gates* que incluem as subpopulações celulares. No gráfico A (*Dot-plot*), através da distribuição por tamanho e granularidade (FSC x SSC), são selecionadas as células eritrocitárias totais. A partir deste *gate* selecionamos os eritrócitos que despolarizam (com conteúdo de hemozoína) e os eritrócitos marcadas com SYBR® Green (DNA).

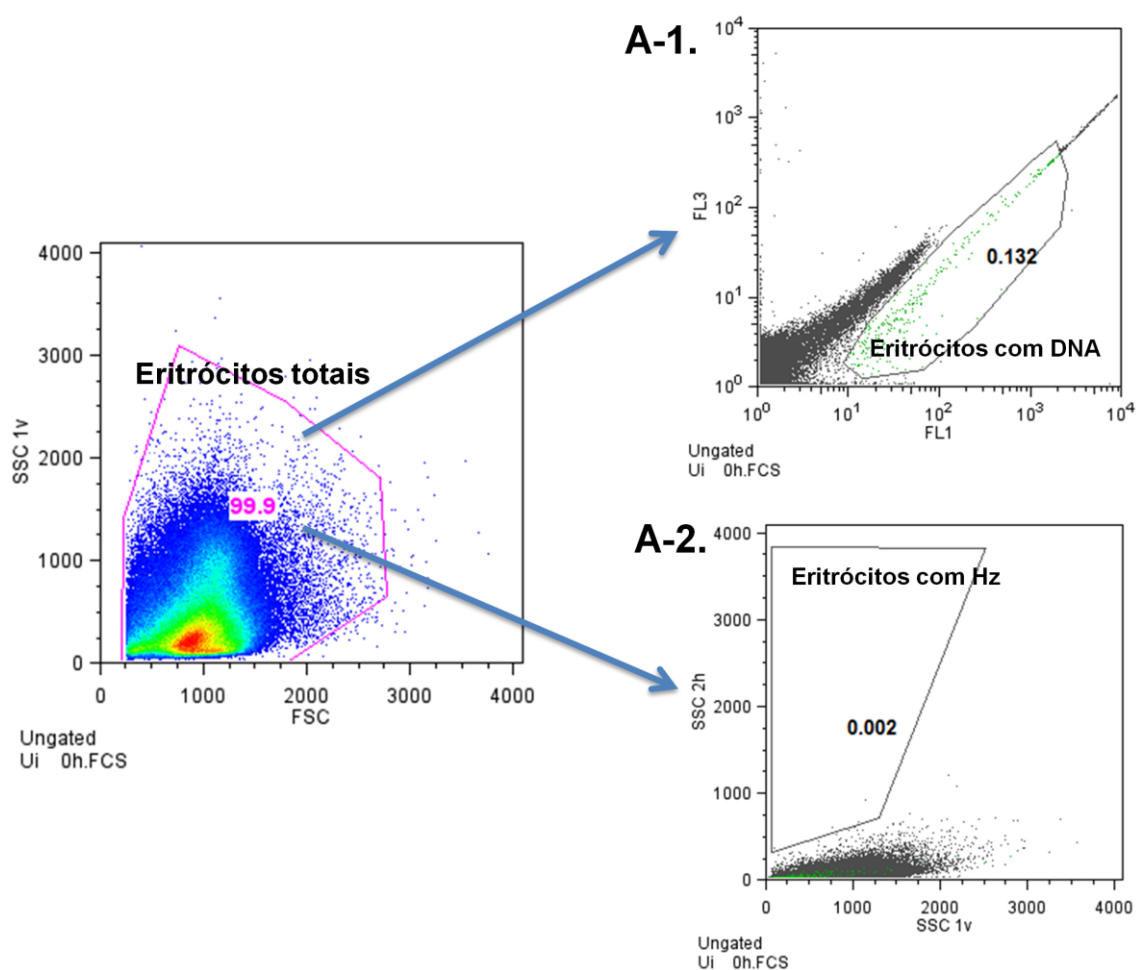


Figura 6: Seleção dos *gates* numa amostra não infectada às zero horas de incubação. A) *gate* com a percentagem total de eritrócitos no *dot-plot* que relaciona tamanho (FSC) e granularidade (SSC). **A-1)** *gate* da percentagem de eritrócitos que emitem fluorescência no *dot-plot* que relaciona as fluorescências (FL1 x FL3). **A-2)** *gate* com a percentagem de eritrócitos que despolarizam no *dot-plot* que relaciona granularidade (SSC 1v) e despolarização (SSC 2h). Os eventos marcados a verde em A-1 e A-2, representam as células que são SYBR Green positivas.

A partir da amostra não infetada selecionamos o *gate* dos eventos que despolarizam (eritrócitos com conteúdo em hemozoína) que nos permitiu avaliar o grau de

maturação dos parasitas ao longo da experiência, uma vez que as formas imaturas não possuem hemozoína ou possuem em menor quantidade em comparação com as formas mais maduras. O *gate* dos eventos que fluorescem (eritrócitos com conteúdo em DNA) também é desenhado a partir da amostra não infectada e permite avaliar a parasitemia (percentagem de eritrócitos infectados sobre o total de eritrócitos) das amostras. Com o *gate* que delimita os eventos marcados com SYBR® Green, podemos observar que mesmo a amostra não infectada possui um *background* de fluorescência (figura 6. A-1).

Os mesmos *gates* que foram delineados para a amostra não infectada, são aplicados a todas as outras amostras analisadas (figura 7 e 8).

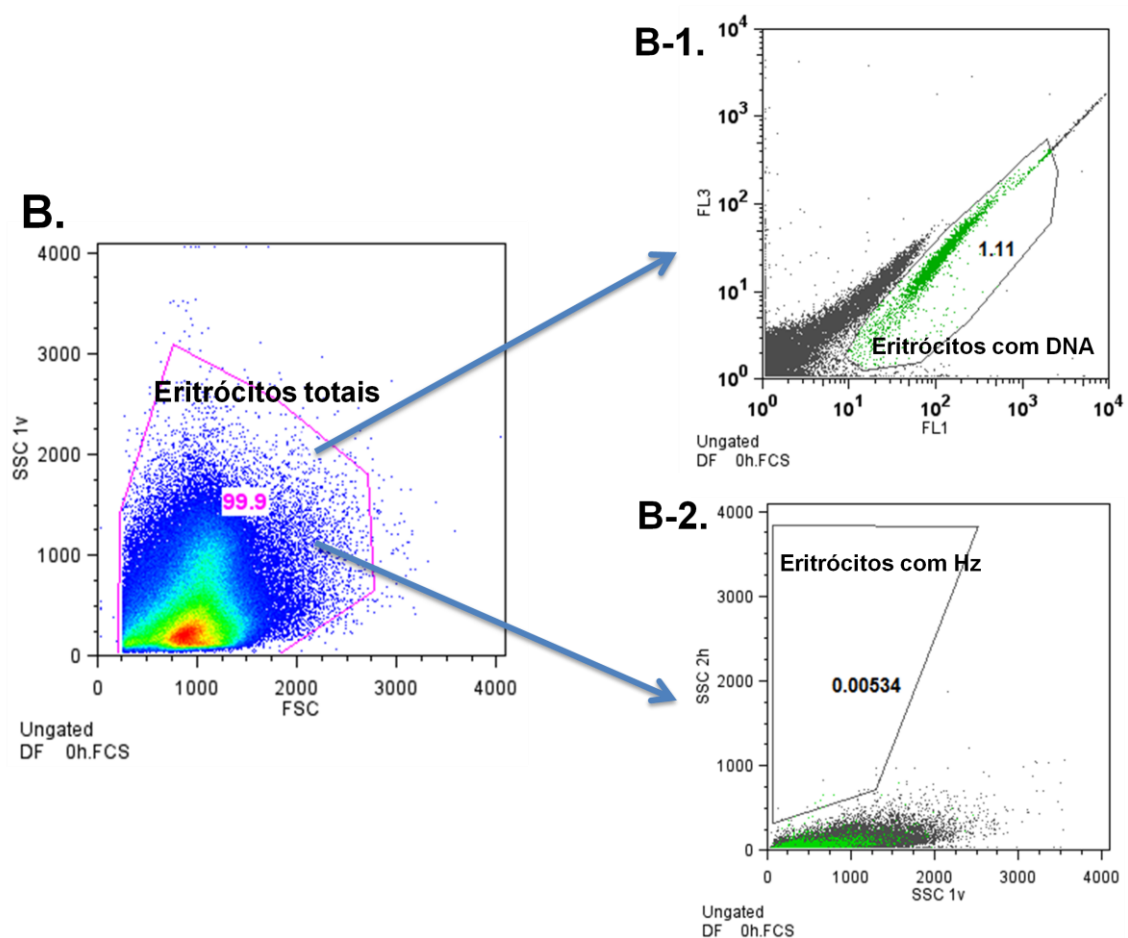


Figura 7: Gates aplicados a uma amostra infectada sem adição de fármaco, às zero horas de incubação. Os mesmos *gates* delineados para a amostra não infectada são aplicados às restantes amostras, nos diferentes tempos de incubação. **B-1)** *gate* com a percentagem de eritrócitos que emitem fluorescência. **B-2)** *gate* com a percentagem de eritrócitos que despolarizam. Os eventos marcados a verde em B-1 e B-2, representam as células que são SYBR Green positivas.

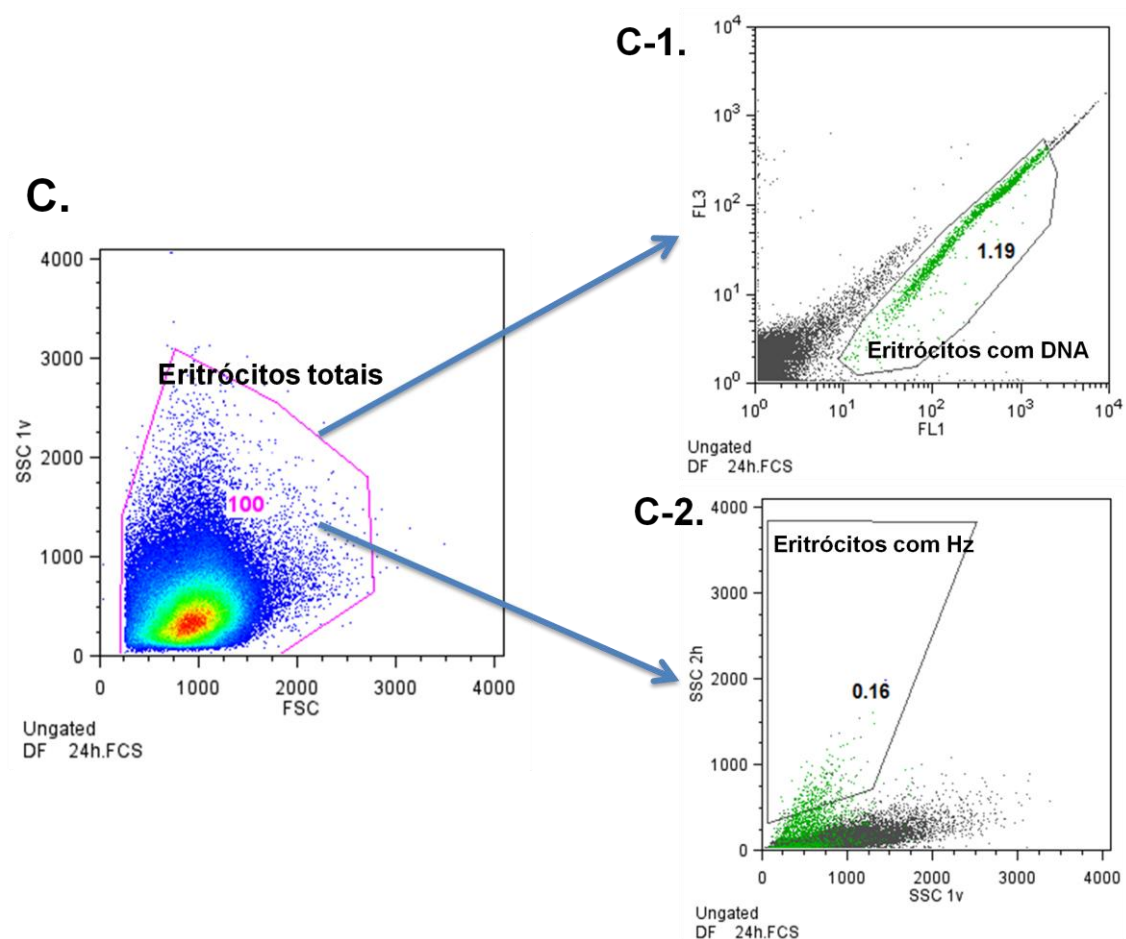


Figura 8: Amostra infetada sem adição de fármaco, às 24 horas de incubação. C-1) gate com a percentagem de eritrócitos que emitem fluorescência. **C-2)** gate com a percentagem de eritrócitos que despolarizam. Os eventos marcados a verde em C-1 e C-2, representam as células que são SYBR Green positivas.

No início da experiência (às zero horas de incubação), não existe uma diferença notável entre as percentagens de eritrócitos que despolarizam numa amostra não infetada (figura 6. A-2) e outra infetada (figura 7. B-2). Isto deve-se ao facto de no início da experiência, a amostra infetada possuir parasitas sob a forma imatura em anel, cujo pigmento malárico não está formado. A diferença entre as duas amostras é só em termos de percentagem de eventos fluorescentes. Na amostra infetada, das 0 às 24 horas de incubação, é possível observar o aumento da despolarização com maturação do parasita (figura 8. C-2), enquanto o valor da fluorescência mantém-se o mesmo (figura 8. C-1).

As análises foram realizadas em intervalos de tempo de 6 horas, durante 48 a 72 horas. Durante um ciclo de vida intra-eritrocítico de *P. falciparum* (48 horas), em cultura sincronizada, observa-se um aumento da despolarização entre as 18 horas e as 30 horas de incubação (figura 9), que corresponde ao desenvolvimento do parasita de trofozoíto imaturo (estádio em anel) a esquizonte, ou seja, há a formação de

hemozoina. A partir das 30 horas o valor da despolarização começa a decrescer porque o parasita replica, o que é confirmado pelo aumento do valor da fluorescência (eventos marcados com SYBR® Green).

A partir das células SYBR® Green positivas, incluídas no gate do gráfico relativo às fluorescências (FL1 x FL3), foi possível também observar a sua distribuição relativamente aos parâmetros de granularidade e despolarização (SSC 1v x SSC 2h). Às zero horas de incubação, as células com fluorescência verde encontravam-se todas fora do gate da despolarização (ver imagem 7. B-2), mas com o decorrer da experiência, as células que emitiam fluorescência eram as mesmas que despolarizavam (ver imagem 8. C-2).

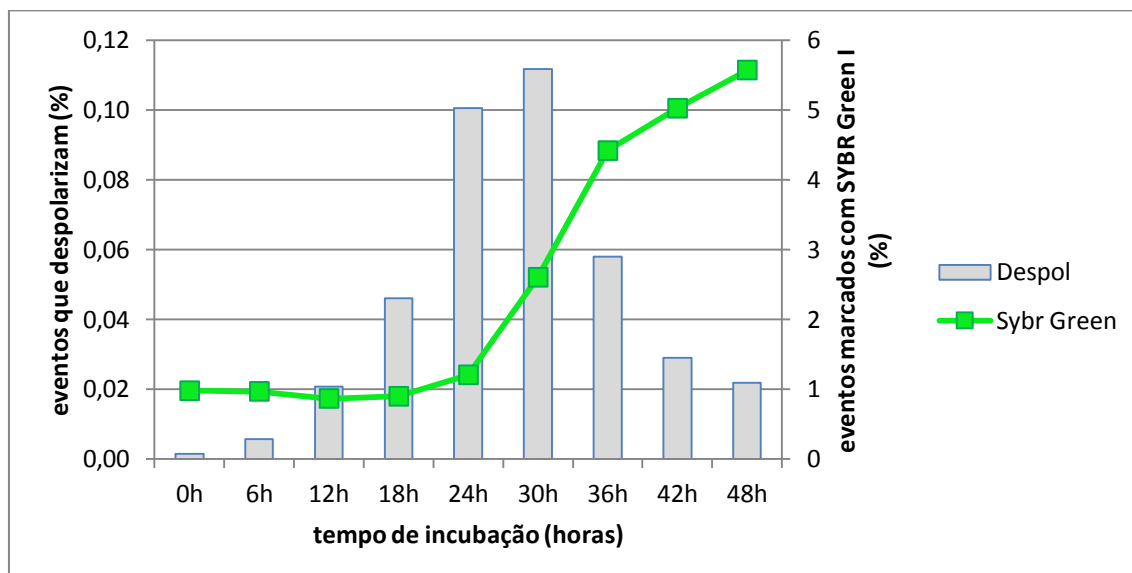


Figura 9: Variação dos valores da despolarização e fluorescência para uma amostra infectada sem adição de fármaco, durante o período de incubação.

1.1 Teste de sensibilidade

Através da técnica de citometria de fluxo, com a deteção simultânea da despolarização e da fluorescência, foi possível observar o grau de inibição de crescimento de *Plasmodium falciparum* sob a acção de determinados fármacos com diferentes concentrações, o que por sua vez permitiu calcular a concentração necessária para inibir 50% dos parasitas (IC_{50}).

Os resultados estão ordenados de acordo com as diferentes classes de antimaláricos.

1.1.1 Fármacos inibidores da síntese de hemozoína

Para os fármacos derivados de quinolinas, somente é apresentado o gráfico de cloroquina, visto os gráficos relativos à mefloquina, quinina e lumefantrina serem relativamente semelhantes.

Na figura 10 podemos observar, na amostra incubada sem fármaco, que o parasita começa a desenvolver o pigmento a partir das 12 horas de incubação (trofozoito), atingindo o máximo da despolarização às 30 horas (esquizonte). A partir desse ponto, os parasitas iniciam a replicação e a despolarização começa a decair até às 48 horas. A seguir às 48 horas, inicia-se um novo ciclo e a despolarização volta a aumentar com a maturação dos parasitas. As amostras incubadas com fármacos em concentrações subinibitórias (cloroquina a 6 e 12 nM) acompanham a curva da amostra sem fármaco. Já as amostras que sofreram inibição do crescimento (com cloroquina em concentrações a partir de 25 nM), não acompanham a curva normal da amostra sem fármaco, mantendo sempre a despolarização inicial.

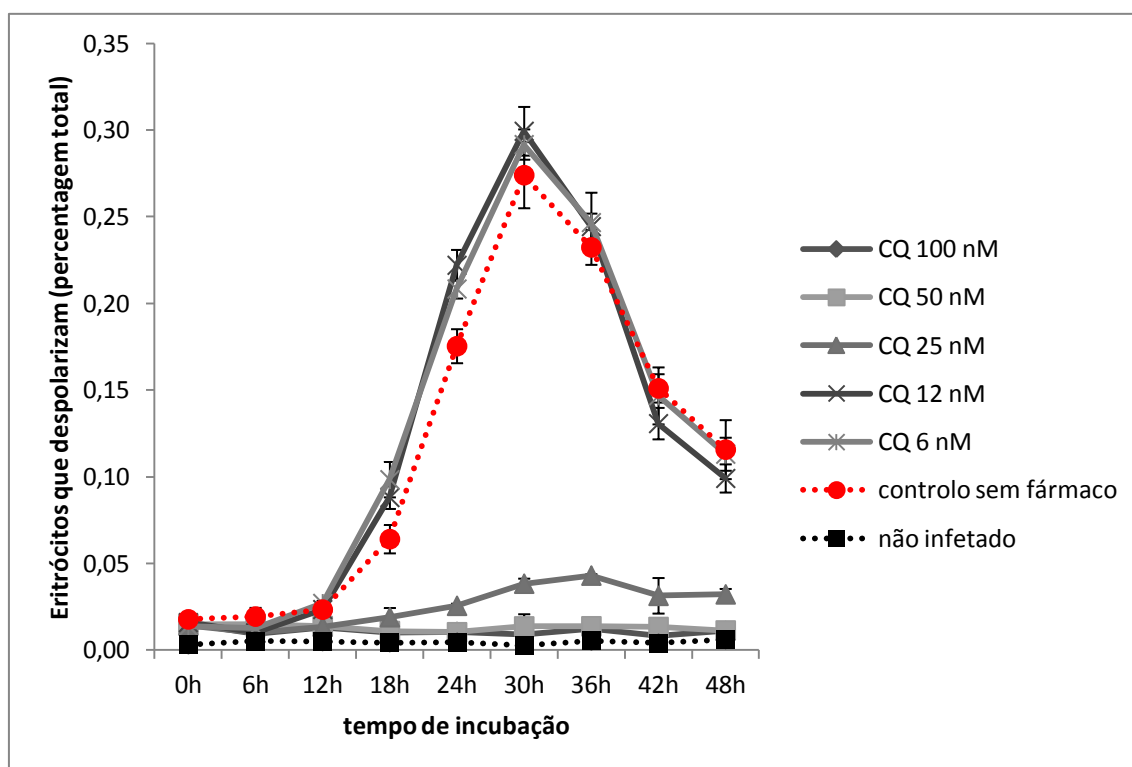


Figura 10: Curva de detecção da despolarização durante a incubação da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com o fármaco cloroquina (CQ) a diferentes concentrações. A cultura sincronizada foi incubada durante 48 horas e foram realizadas medições em intervalos de 6 horas.

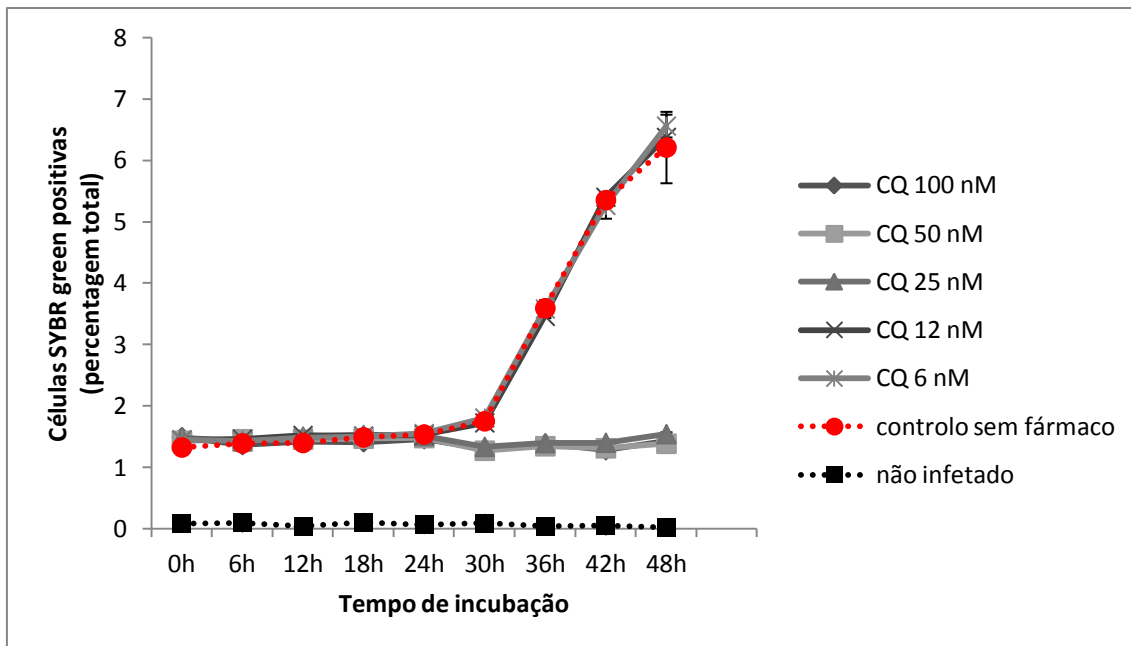


Figura 11: Curva de detecção da fluorescência do SYBR® Green durante a incubação da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com o fármaco cloroquina (CQ) a diferentes concentrações.

Também foi testada a estirpe resistente à cloroquina (Dd2), com as mesmas concentrações usadas para a estirpe sensível. Para todas as concentrações observou-se um crescimento idêntico à amostra incubada sem fármaco.

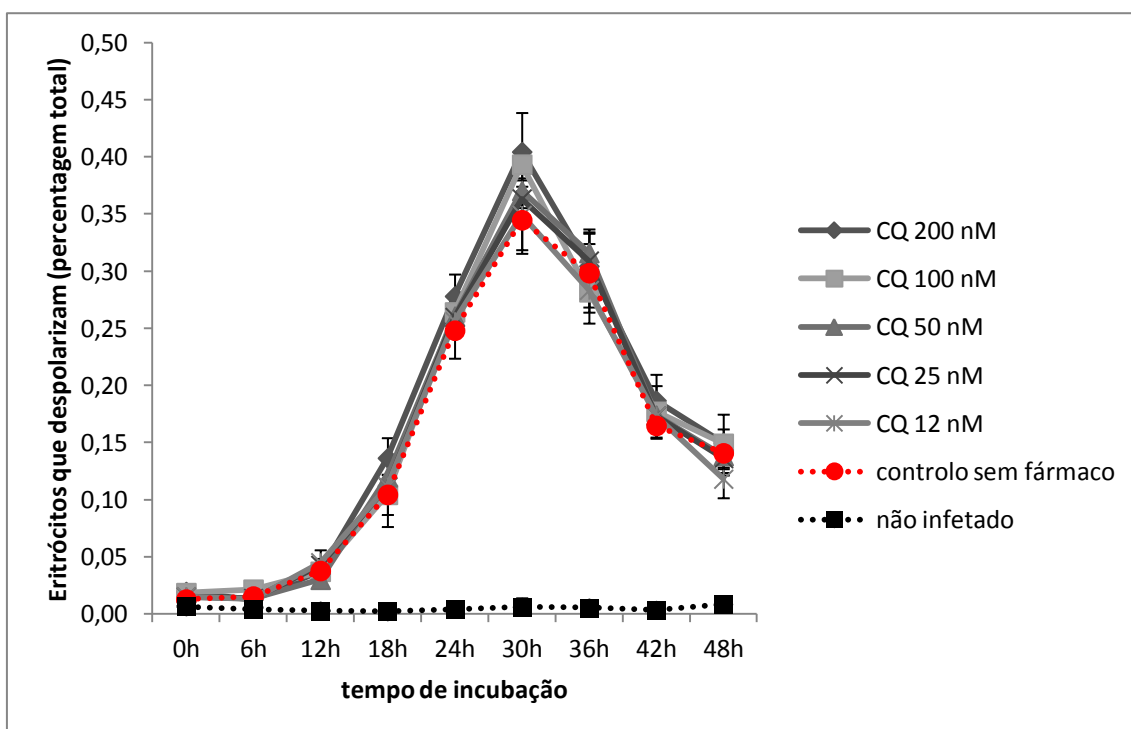


Figura 12: Curva de detecção da despolarização durante a incubação da estirpe Dd2 de *P. falciparum* (resistente à cloroquina) com o fármaco cloroquina (CQ) a diferentes concentrações. Neste ensaio não houve inibição da maturação do parasita em qualquer das concentrações de fármaco usadas.

1.1.2 Fármacos inibidores da síntese de folatos

Como exemplo dos fármacos antifolatos, foi utilizada a pirimetamina. Com este fármaco não foi possível calcular um IC_{50} antes das 48 horas de incubação, uma vez que só se deteta o efeito na segunda geração de parasitas. Por conseguinte, para este fármaco a incubação e análise das amostras prolongou-se até às 72 horas.

Neste caso o parasita madura em todas as concentrações de fármaco, inclusivamente com a concentração mais elevada foi possível detetar parasitas na forma madura (mantêm a despolarização elevada mesmo após as 30 horas), mas não replicam. Para as concentrações de 50 e 100 nM, os parasitas exibem um decréscimo na despolarização após as 30 horas, porque alguns chegam a re-invadir novos eritrócitos, mas não são capazes de maturar, ou seja, perdem a viabilidade.

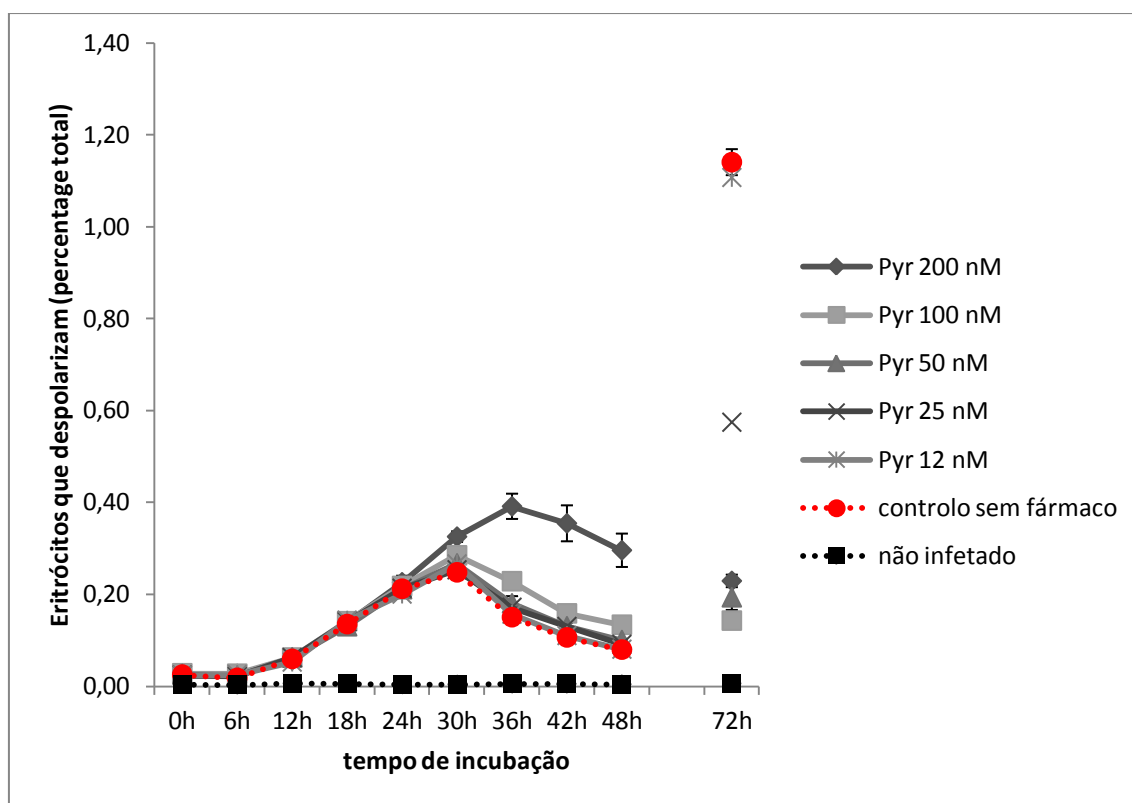


Figura 13: Curva de detecção da despolarização durante a incubação da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com o fármaco pirimetamina (PYR) a diferentes concentrações. Para este fármaco, o melhor tempo de medição obteve-se às 72 horas de incubação.

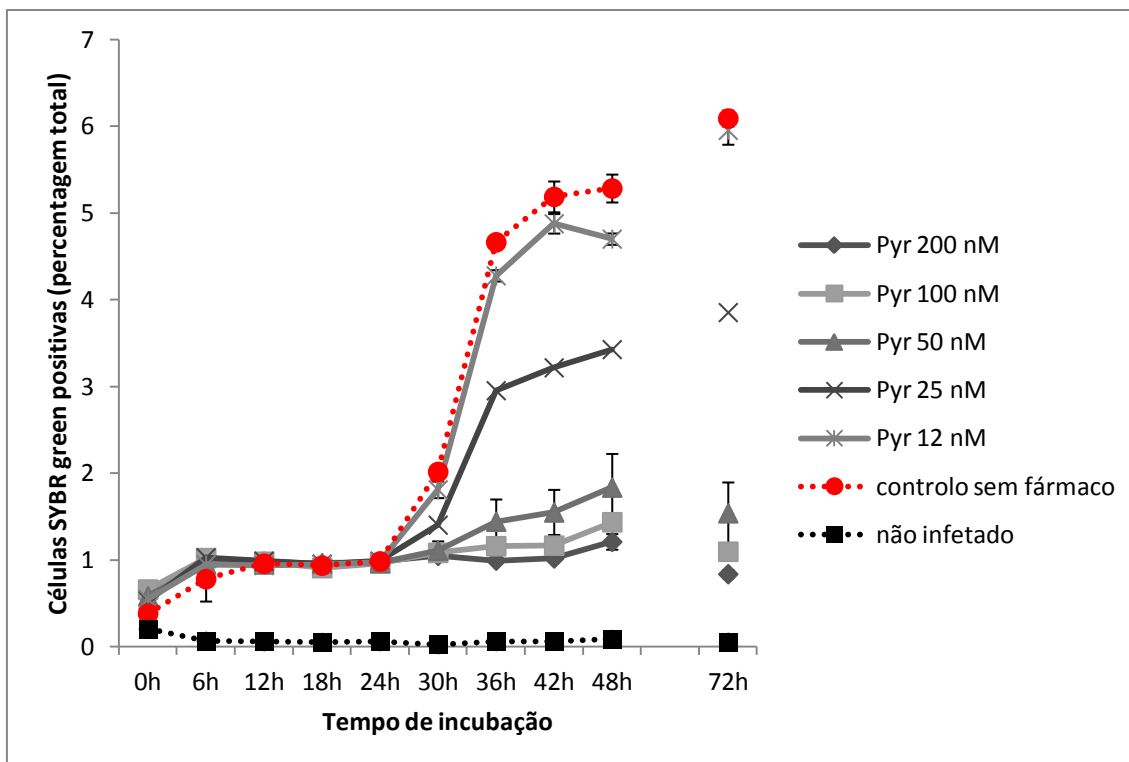


Figura 14: Curva de detecção da fluorescência do SYBR® Green durante a incubação da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com o fármaco pirimetamina (PYR) a diferentes concentrações.

1.1.3 Peróxidos

Para os fármacos derivados de artemisininas (artemisinina, artesunato e dihidroartemisinina), só é apresentado o gráfico do fármaco artemisinina, visto os restantes serem semelhantes.

Na concentração de artemisinina a 32 nM observou-se um atraso na maturação e replicação do parasita, o que acontece também com o artesunato a 4 nM.

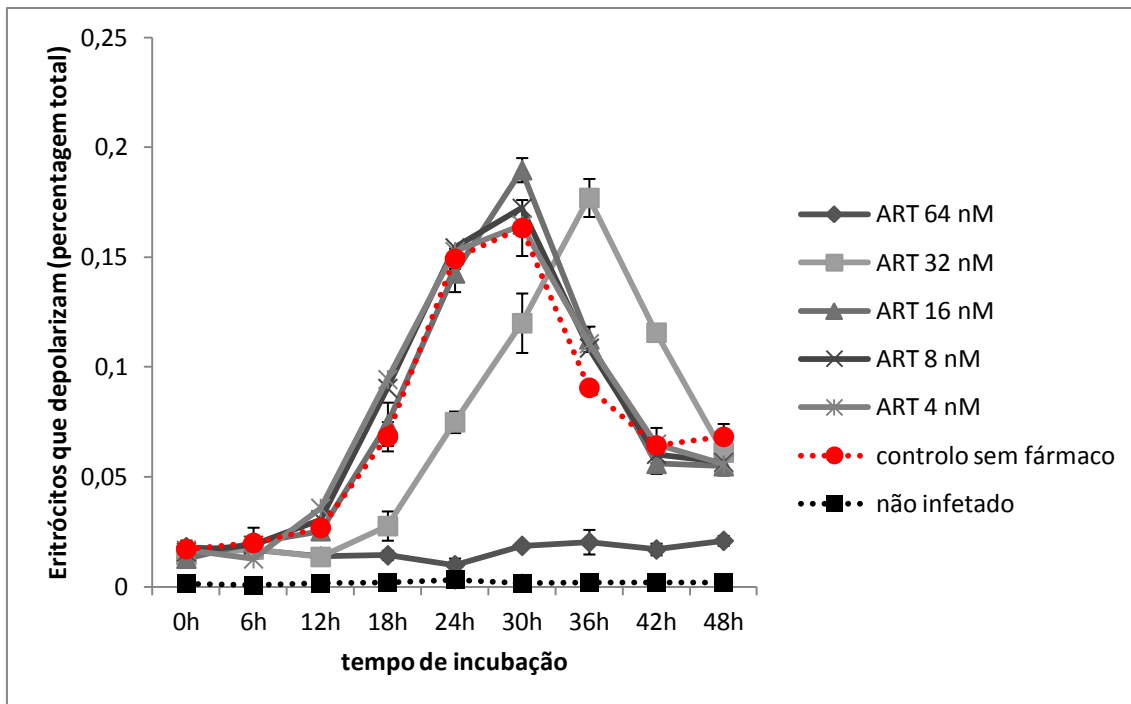


Figura 15: Curva de detecção da despolarização durante a incubação da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com o fármaco artemisinina (ART) a diferentes concentrações.

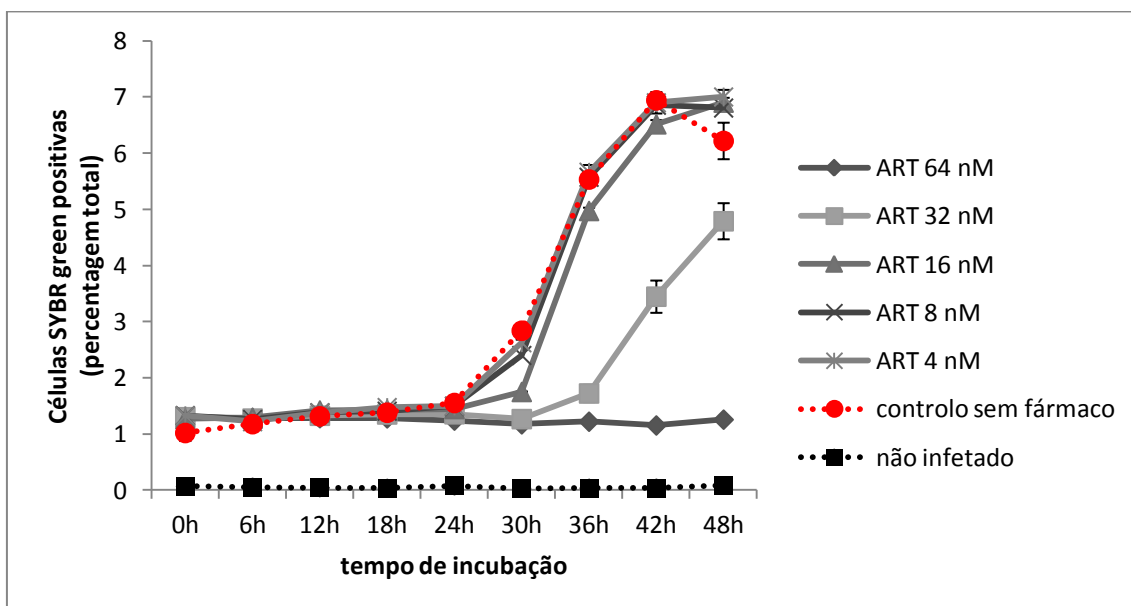


Figura 16: Curva de detecção da fluorescência do SYBR® Green durante a incubação da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com o fármaco artemisinina (ART) a diferentes concentrações.

2. Resumo dos IC₅₀ calculados

Para demonstrar que as atividades dos antimaláricos determinadas por citometria eram consistentes com as atividades medidas pelo ensaio convencional de HRP II, a dose citotóxica para 50% dos parasitas foi determinada para os diferentes antimaláricos na estirpe 3D7.

Os IC₅₀, foram definidos utilizando o método de curva de dose-resposta sigmoide. Para os diferentes métodos foram definidos os melhores tempos para calcular o IC₅₀. Para a técnica da detecção da despolarização foi possível calcular às 24h, para o SYBR® Green às 48h e HRP2 às 72h.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ calculados a partir da inibição da estirpe 3D7 com fármacos derivados de quinolinas

Cloroquina			Quinina			Mefloquina			Lumefantrina		
Hz ¹⁾	SG	HRPII	Hz ¹⁾	SG	HRPII	Hz ¹⁾	SG	HRPII	Hz ¹⁾	SG	HRPII
18 - 23,7	20,5	22,4	65,1 - 101	72,5	52,2	18,5 - 29,5	33,6	21,3	37,3	61,7	27,9

Os valores de IC₅₀ estão apresentados em nM. Hz = ensaio de detecção da despolarização; SG = ensaio de detecção da fluorescência do SYBR Green; HRPII = ensaio de “*Histidine Rich Protein II*”.

1) Limites (mínimo e máximo) dos valores de IC₅₀. Para o ensaio da detecção da hemozoína, cada fármaco foi testado pelo menos duas vezes, à exceção da lumefantrina.

Tabela 3: Valores dos IC₅₀ calculados a partir da inibição da estirpe 3D7 com fármacos antifolatos e derivados de artemisinina

Pirimetamina*			Artemisinina			Artesunato			Dihidroartemisinina		
Hz ¹⁾	SG	HRPII	Hz ¹⁾	SG	HRPII	Hz ¹⁾	SG	HRPII	Hz ¹⁾	SG	HRPII
25,1 - 35,9	30,5	30,5	16 - 32	43,3	11,2	4 - 9,4	4,6	1,1	1,7 - 8	2,5	<4

Os valores de IC₅₀ estão apresentados em nM. Hz = ensaio de detecção da despolarização; SG = ensaio de detecção da fluorescência do SYBR Green; HRPII= ensaio de “*Histidine Rich Protein II*”. *para a pirimetamina os cálculos foram realizados às 72h

1) Limites (mínimo e máximo) dos valores de IC₅₀. Para o ensaio da detecção da hemozoína, cada fármaco foi testado pelo menos duas vezes.

Discussão

1. Citometria - avaliação da atividade antimalárica dos fármacos, durante a fase eritrocitária do parasita.

A deteção ótica de hemozoína, foi possível graças a uma simples adaptação de um citómetro de fluxo, de forma a poder detetar a luz despolarizada. A modificação do citómetro foi descrita por Frita *et al*⁴⁰, e nesse estudo já havia sido demonstrado que a hemozoína poderia ser detetada em eritrócitos de ratinho infetados por *Plasmodium berghei*.

No seguimento desse estudo, comprova-se neste trabalho que a hemozoína pode também ser detetada por citometria de fluxo, em eritrócitos humanos em cultura, infetados por *Plasmodium falciparum*, permitindo desta forma monitorizar a maturação do parasita e consequentemente o efeito inibitório de fármacos antimaláricos.

1.1. Deteção de hemozoína do parasita

Com este método, os melhores tempos de medição, serão aqueles em que o parasita já se encontra maduro o suficiente para se conseguir detetar o seu conteúdo em hemozoína. O número e o tamanho dos cristais de hemozoína no eritrócito infetado dependem do estágio do parasita, sendo que, quanto mais maduro for o parasita, maior será o sinal de despolarização.

Nas primeiras horas de incubação (até 6 horas), o sinal de despolarização é semelhante numa amostra não infetada e numa infetada. Este fenómeno não se deve a um erro de inoculação ou a condições de cultura desfavoráveis. Durante o estudo da sensibilidade, inicialmente a parasitémia e a sincronização eram confirmados por exame microscópico e garantiu-se também as condições ideais para o crescimento do parasita, com nutrientes suficientes para que pudesse sobreviver por um ciclo de vida sem haver necessidade renovar o meio, isto através de um hematócrito (2,5%) e uma parasitémia inicial (1%) baixos³².

Esta indistinção inicial da despolarização, deve-se antes ao facto da maioria dos parasitas, na amostra infetada, estarem imaturos (em forma de anel), sem hemozoína ainda formada.

Às 24 horas de incubação, e em alguns casos até mesmo a partir das 18 horas, os parasitas estão sob a forma de trofozoito (já possuem cristal), e a partir desses tempos de incubação já é possível observar um aumento da despolarização nas amostras em que o parasita não sofreu inibição do crescimento. Nas amostras onde a concentração de fármaco foi eficaz não se observou o aumento da despolarização, indicando que o parasita sofreu inibição do crescimento.

Em relação à intensidade de sinal, *P. falciparum* apresenta um sinal de despolarização diferente ao observado anteriormente para *P. berghei*⁴⁰. Os níveis de intensidade de sinal de despolarização são maiores nas amostras de sangue de ratinho infetado. Esse fenómeno pode resultar do facto da hemozoina neste caso se encontrar mais dispersa. Num estudo de Warhurst (1974) observou-se que menos de 10% dos parasitas que infetavam eritrócitos de ratinho possuíam o pigmento agregado, encontrando-se a maioria em forma dispersa⁴¹. Já em esquizontes da espécie *P. falciparum*, a hemozoina aparece sempre agregada numa única massa (examinado por microscopia, ver figura 17). Portanto, a diferença na dispersão/agregação da hemozoina poderá estar na origem da diferença de sinal detetado em ambos os casos.

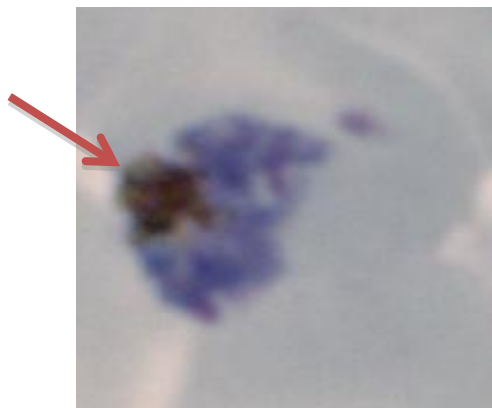


Figura 17: Esfregaço sanguíneo obtido a partir de uma cultura de *P. falciparum*. A hemozoina está agregada dentro do esquizonte (seta).

Não está estabelecido um limite de deteção para os testes de sensibilidade. Mas uma vez que podem ser usados na monitorização de resistências em doentes, o ideal seria possuir um limite mínimo idêntico ao definido para testes de diagnóstico, ou seja, próximo de 0,002% de parasitémia⁴².

Atualmente, com o método de HRP II, podem ser utilizadas amostras com parasitémias a partir de 0,01% (sendo este um dos métodos que possui o limite mais

baixo de detecção)³³ e para o método de referência da incorporação da hipoxantina a parasitemia inicial deve estar entre 0,25% - 0,5%⁴³.

Com o ensaio da detecção da hemozoína por citometria, os testes foram realizados a 1% de parasitemia, pelo que, mais ensaios serão necessários para determinar quais os limites de parasitemias aplicáveis.

1.1.1. Fármacos inibidores de hemozoína

A cloroquina e os outros derivados de quinolonas (mefloquina, quinina e lumefantrina) foram os fármacos que produziram os resultados mais evidentes.

O mecanismo de ação deste grupo de fármacos está envolvido na inibição da formação da hemozoína do parasita^{14,15}. Este fenómeno foi detetado por citometria entre as 18 e 24 horas de incubação, altura em que o parasita, caso não esteja a sofrer inibição por ação do fármaco, estará a passar para a forma de esquizonte com o pigmento já formado.

As curvas de crescimento obtidas com a estirpe resistente à cloroquina (Dd2), em todas as concentrações de fármaco usadas, foram idênticas à curva obtida sem adição de fármaco, ou seja, não houve inibição do crescimento do parasita. Ao comparar os gráficos obtidos com a estirpe resistente (Dd2) e a estirpe sensível (3D7), pode-se verificar que, com este ensaio, a resistência aos fármacos é facilmente distinguida.

1.1.2. Fármacos inibidores de folatos

A pirimetamina é um fármaco que interfere na síntese de DNA, que ocorre nas fases mais tardias do desenvolvimento do parasita (após 24 horas), ou seja, o parasita matura até a forma de esquizonte, mas perde a capacidade de formar merozoítos viáveis. Deste modo a sua atividade só pode ser detetada tardiamente, na segunda geração. Consequentemente, o efeito inibitório deste fármaco só foi detetado às 72 horas. Curiosamente, as amostras tratadas com a concentração mais elevada, de 200 nM, a partir 30 horas mostraram uma percentagem aumentada de “eventos que despolarizam”, relativamente ao controlo não tratado. A observação microscópica de amostras (tratadas com pirimetamina a 200 nM) das 36h e 48h permitem concluir que esta concentração tão elevada leva à acumulação (“arrest”) dos esquizontes.

1.1.3. Peróxidos

Em relação à artemisinina e derivados, os mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados, mas trata-se de um grupo com um modo de ação rápido⁴⁴.

Tal como para os fármacos inibidores de hemozoína, foi possível observar um efeito de inibição logo entre as 18 e as 24 horas de incubação.

Os valores de IC₅₀ obtidos para a artemisinina foram superiores aos obtidos com os restantes derivados de artemisinina, o que pode revelar a fraca estabilidade do fármaco em solução aquosa, que se reflete na sua menor eficácia⁴⁵.

No estudo da sensibilidade à artemisinina e derivados, notou-se uma diferença dos IC₅₀ obtidos pelo método de citometria (despolarização e SYBR Green) e pelo método do HRP II, que pode ser explicado pelo “efeito de inóculo”. O que significa dizer que, a concentração de inibição do fármaco é afetada pela maior (1-2% em citometria) ou menor (0,05% no HRP2) concentração de parasitas na amostra aplicada. A influência da parasitemia sobre a acção do fármaco já foi descrita para a cloroquina⁴⁶, mefloquina, artemisina e derivados⁴⁷.

A fim de evitar o efeito do tamanho do inóculo, os testes para a determinação da sensibilidade do parasita da malária aos fármacos, idealmente devem possuir uma parasitemia padronizada, de forma a facilitar a comparação de resultados.

1.2. SYBR Green I ®

O SYBR Green I, neste ensaio, foi utilizado para confirmar se os eventos detetados eram de facto eritrócitos infetados e se esses eritrócitos sofriam lise. Desta forma, o crescimento do parasita pode ser quantificado através da medição da fluorescência do SYBR Green I ligado ao DNA do parasita. Os reticulócitos que também existem na circulação sanguínea podem ligar-se ao SYBR Green, mas esta ligação é menos específica, uma vez que estes possuem ácidos nucleicos do tipo RNA, podendo por isso observar-se um *background* de fluorescência, mesmo em amostras não infetadas. Portanto, a fluorescência é limitada ao *Plasmodium* devido à maior afinidade que o corante possui pelo DNA e porque os eritrócitos maduros em circulação não possuem ácidos nucleicos³⁷.

2. Comparação entre métodos

Os resultados das concentrações responsáveis pela inibição de 50% dos parasitas (IC_{50}), foram comparados com os resultados obtidos por outros grupos de investigação, que utilizaram o método de referência da incorporação da hipoxantina e a estirpe de *P. falciparum* 3D7.

Tabela 4: Comparação dos valores de IC_{50} (nM) entre o ensaio da detecção de hemozoína por citometria e o ensaio da incorporação da hipoxantina

Fármaco antimalárico	Ensaio da hemozoína (limites) ¹⁾	Ensaio de incorporação da Hipoxantina na literatura (limites) ²⁾
Cloroquina	18 – 23,7	6 – 29,6 ⁴⁸⁻⁵⁹
Quinina	65,1 – 101	47,1 – 126 ^{48-50,55,58}
Mefloquina	18,5 – 29,5	6,11 – 42,6 ^{48-50,55,}
Lumefantrina	37,3	7,46 – 87 ^{49,52,55,56}
Pirimetamina	25,1 – 35,9	5 – 78,4 ^{49,51,53,59}
Artemisinina	16 – 32	10,11 – 22 ^{54,55,58}
Artesunato	4 – 9,2	0,434 – 9,44 ^{27,48-51}
Dihidroartemisinina	1,7 – 8	2 – 5,27 ^{27,52,55,56}

1) Limites (mínimo e máximo) dos valores de IC_{50} . Para o ensaio da detecção da hemozoína, cada fármaco foi testado pelo menos duas vezes, à exceção da lumefantrina.

2) Limites (mínimo e máximo) dos valores de IC_{50} encontrados na literatura

A grande diferença dos resultados observados pelos diferentes laboratórios/estudos, utilizando a mesma técnica e estirpe de *Plasmodium*, pode dever-se a diferenças na metodologia do ensaio (por exemplo, diferentes parasitémias e hematócritos iniciais) e diferenças nas culturas de parasitas (por exemplo, cultura sincronizada ou não).

Todos os valores de IC_{50} registados no nosso ensaio encontram-se dentro do limite dos valores observados nos outros estudos, com exceção da artemisinina cujo valor foi ligeiramente superior. Esse valor aumentado pode ser explicado pelo efeito de inóculo, visto nos outros estudos utilizarem uma parasitémia inicial de 0,5% que corresponde a metade da parasitémia inicial utilizada neste estudo (1%)⁴⁷.

3. Vantagens da detecção de hemozoína por citometria de fluxo

Os testes de sensibilidade *in vitro* são utilizados atualmente no rastreio de novos compostos antimaláricos em estirpes de referência e na monitorização de resistências em isolados clínicos^{27,58}.

Com o método de detecção de hemozoína por citometria de fluxo, surge um novo teste de sensibilidade *in vitro*, que permite medir de uma forma simples e em tempo real a maturação e a percentagem de inibição do crescimento do parasita por ação de fármacos, sem a necessidade de adição de reagentes.

Estas características são uma mais valia para o método, porque possibilita a avaliação do modo de ação dos fármacos - permite distinguir fármacos de ação rápida ou não e ainda poderá providenciar informações quanto à especificidade da ação do fármaco (em que estágio atua) - visto que as outras técnicas existentes atualmente, só permitem a medição do efeito dos fármacos às 48 horas (método de SYBR Green e o método isotópico)^{43,60} ou até mesmo 72 horas de incubação (HRP II)³³, o que torna estas técnicas inadequadas para o uso em ensaios de duração mais curta.

Conclusão

Os testes *in vitro* de suscetibilidade aos fármacos têm um papel fulcral nas estratégias que visam a descoberta de novos compostos antimaláricos ou na monitorização do surgimento de resistências a fármacos em isolados clínicos.

A metodologia da citometria de fluxo, apesar do custo inicial, permite uma análise rápida, eficiente e quantitativa de células em suspensão. Ao aplicar a deteção da despolarização por citometria de fluxo, acabou por se desenvolver uma técnica bastante vantajosa e de fácil execução, que exige pouco equipamento e produz resultados rápidos, fiáveis, económicos e em tempo real.

Os resultados do estudo efetuado, abrem caminho a novas investigações. Em circunstâncias futuras, este estudo poderá ser alargado, ao testar a sua aplicação: na análise da atividade antimalárica de novos compostos ("*screening*"); ou na monitorização da sensibilidade do *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos em laboratórios de pesquisa menos equipados para uma identificação rápida da presença de resistência em campo, particularmente em regiões onde a malária é endémica.

Referências

1. World Health Organization. World Malaria Report: 2011. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2011.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf
(acedido em 17 Julho 2012)
2. Forbes BA, Sahm DF, and Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th (Ed). Mosby Company. Missouri. 2007; 599-605.
3. Goldberg DE, Cowman AF. Moving in and renovating: exporting proteins from Plasmodium into host erythrocytes. Nat. Rev. Microbiol. 2010; 8:617–621
4. Hänscheid T, Egan TJ, Grobusch MP. Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. Lancet Infect Dis. 2007; 7(10):675-85.
5. Moore LR, Fujioka H, Williams PS, Chalmers JJ, Grimberg B, Zimmerman PA, Zborowski M. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. FASEB J. 2006; 20(6):747-9
6. World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria* 2nd edition. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2010.
7. White NJ (1999). Antimalarial drug resistance and combination therapy. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B, Biological Sciences*, 354:739–749.
8. Cox F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors 2010; 3:5.
9. Butler AR, Khan S, Ferguson E. A brief history of malaria chemotherapy. Journal of Royal College of Physicians Edinburg 2010; 40: 172–7.
10. Krafts K, Hempelmann E, Skórska-Stania A "From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy". *Parasitol Res.* 2012; 11 (1): 1-6.
11. Farooq U, Mahajan RC. Drug resistance in malaria. J Vector Borne Dis. 2004; 41(3-4):45-53.
12. Neill US. From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria. J Clin Invest. 2011; 121(10):3768-73.
13. Schlitzer M. Malaria chemotherapeutics part 1: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. Chem Med Chem. 2007; 2, 944-986.

14. Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 15;93(21):11865-70.
15. Mungthin M, Bray PG, Ridley RG, Ward SA. Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols, and phenanthrene methanols. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(11):2973-7.
16. Milhous WK, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE. In vitro activities of and mechanisms of resistance to antifol antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 27(4):525-30
17. Olliaro P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther*. 2001; 89:207
18. Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol*. 2001; 17(3):122-6.
19. Basilico N, Pagani E, Monti D, Olliaro P, Taramelli D. A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42(1):55-60.
20. Bloland PB. Drug Resistance in Malaria. World Health Organization Press, Geneva, Switzerland, 2001.
21. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(4):209-18.
22. Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, Tsuyuoka R, Maguire JD, Fandeur T, Arie F, Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Pfm^{dr1} and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76(4):641-7.
23. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, Socheat D, Arie F, Wongsrichanalai C. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in southern Cambodia. *Malar J*. 2009; 12;8:10
24. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(5):716-9
25. D'Alessandro U, Buttiens H. History and importance of antimalarial drug resistance. *Trop Med Int Health*. 2001; 6:845-8.
26. White N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B*. 1999; 354, 739-749.

27. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med. 2009; 361:455–467.
28. Dondorp AM, Fairhurst RM, Slutsker L, Macarthur JR, Breman JG, Guerin PJ, Wellems TE, Ringwald P, Newman RD, Plowe CV. The threat of artemisinin resistant malaria. N Engl J Med. 2011; 365(12):1073-5.
29. World Health Organization. Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance 2000–2010. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2010.
30. Trager W & Jensen J B. Human malaria parasites in Continuous culture. Science. 1976; 193:673-5.
31. Noedl, H., Wongsrichanalai, C., and Wernsdorfer, W. H. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. Trends Parasitol. 2003; 19(4):175-181.
32. Basco LK. Field Application of in vitro Assays for the Sensitivity of Human Malaria Parasites to Antimalarial Drugs. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2007.
33. Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:3575–3577.
34. Karl S, Wong RP, St Pierre TG, Davis TM. A comparative study of a flow-cytometry-based assessment of in vitro *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. Malar J. 2009; 14;8:294.
35. Grimberg BT. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. J Immunol Methods. 2011; 31;367(1-2):1-16
36. Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(2):167-95.
37. Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. Plasmodium falciparum: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. Exp Parasitol. 2009; 121(2):144-50.
38. Molecular Probes, inc. SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain. Oregon, E.U.A., 2006. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07567.pdf> (Acedido em 7 de Outubro 2012)

39. Hänscheid T, Melo-Cristino J, Pinto BG. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 64(5-6):290-2.
40. Frita R, Rebelo M, Pamplona A, Vigarío AM, Mota MM, Grobusch MP, Hänscheid T. Simple flow cytometric detection of haemozoin containing leukocytes and erythrocytes for research on diagnosis, immunology and drug sensitivity testing. *Malaria journal.* 2011; 10:74
41. Warhurst DC, Homewood CA, Baggageley VC. The chemotherapy of rodent malaria. XX. Autophagic vacuole formation in *Plasmodium berghei* in vitro. *Ann Trop Med Parasitol.* 1974; 68(3):265-81
42. Hänscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol.* 1999; 21(4):235-45.
43. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 16(6):710-8.
44. Sanz LM, Crespo B, De-Cózar C, Ding XC, Llergo JL, Burrows JN, García-Bustos JF, Gamo FJ. *P. falciparum* in vitro killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. *PLoS One.* 2012; 7(2):e30949.
45. Lin AJ, Klayman DL, Milhous WK. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. *J Med Chem.* 1987; 30(11):2147-50.
46. Gluzman IY, Schlesinger PH, Krogstad DJ. Inoculum effect with chloroquine and *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31(1):32-6.
47. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. Inoculum effect leads to overestimation of in vitro resistance for artemisinin derivatives and standard antimalarials: a Gambian field study. *Parasitology.* 1999; 119: 435–440.
48. Aunpad R, Somsri S, Na-Bangchang K, Udomsangpetch R, Mungthin M, Adisakwattana P, Chaijaroenkul W. The effect of mimicking febrile temperature and drug stress on malarial development. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8: 19.
49. Vivas L, Rattray L, Stewart LB, Robinson BL, Fugmann B, Haynes RK, Peters W, Croft SL. Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semi-synthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 658-665.
50. Lim P, Wongsrichanalai C, Chim P, Khim N, Kim S, Chy S, Sem R, Nhem S, Yi P, Duong S, Bouth DM, Genton B, Beck HP, Gobert JG, Rogers WO, Coppee JY, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O, Ringwald P, Le Bras J, Ariey F.

- Decreased in vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to artesunate, mefloquine, chloroquine, and quinine in Cambodia from 2001 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:2135–2142.
51. Wein S, Maynadier M, Tran Van Ba C, Cerdan R, Peyrottes S, Fraisse L, Vial H. Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5):1651-60.
 52. Wong RP, Salman S, Ilett KF, Siba PM, Mueller I, Davis TM. Desbutyl-lumefantrine is a metabolite of lumefantrine with potent in vitro antimalarial activity that may influence artemether-lumefantrine treatment outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(3):1194-8.
 53. Reynolds JM, Bissati K, Brandenburg J, Günzl A, Mamoun CB. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Pharmacology*. 2007; 7:13-18
 54. Pacorel B, Leung SC, Stachulski AV, Davies J, Vivas L, Lander H, Ward SA, Kaiser M, Brun R, O'Neill PM. Modular synthesis and in vitro and in vivo antimalarial assessment of C-10 pyrrole mannich base derivatives of artemisinin. *J Med Chem*. 2010; 53(2):633-40.
 55. Duraisingh MT, Roper C, Walliker D, Warhurst DC. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2000; 36(4):955-61.
 56. Mwai L, Kiara SM, Abdirahman A, Pole L, Rippert A, Diriye A, Bull P, Marsh K, Borrmann S, Nzila A. In vitro activities of piperazine, lumefantrine, and dihydroartemisinin in Kenyan *Plasmodium falciparum* isolates and polymorphisms in *pfprt* and *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12):5069-73.
 57. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64(5-6):233-41.
 58. Baniecki ML, Wirth DF, Clardy J. High-throughput *Plasmodium falciparum* growth assay for malaria drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(2): 716–723.
 59. Quashie NB, de Koning HP, Ranford-Cartwright LC. An improved and highly sensitive microfluorimetric method for assessing susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in vitro. *Malar J*. 2006; 31;5:95

60. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(5):1803-6